

PATENT COOPERATION TREATY

10/049925

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 03 June 2002 (03.06.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA904421	
International application No. PCT/JP00/05582	International filing date (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence
Name and Address JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION 1-8, Honcho 4 Chome, Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: New applicant for all designated states except US has been recorded in box II.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Junko TAKEUCHI
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 03 June 2002 (03.06.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA904421	
International application No. PCT/JP00/05582	
International filing date (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)	

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent
<input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address MIYAMURA, Tatsuo c/o National Institute of Infectious Diseases, : 1-23-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input type="checkbox"/> the person	<input type="checkbox"/> the name	<input type="checkbox"/> the address
<input type="checkbox"/> the nationality	<input type="checkbox"/> the residence	
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: Applicant in box I has been deleted.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Junko TAKEUCHI
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 03 June 2002 (03.06.02)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA904421	
International application No. PCT/JP00/05582	International filing date (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address NAGAMORI, Seishi 3-42-3, Shiba Minato-ku Tokyo 105-0014 Japan (applicant and inventor for all designated states)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address NAGAMORI, Seishi 3-42-3, Shiba Minato-ku Tokyo 105-0014 Japan (applicant and inventor for US only)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: The change of the status of the applicant has been recorded in box II.		
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Junko TAKEUCHI Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing: 01 March 2001 (01.03.01)	
International application No.: PCT/JP00/05582	Applicant's or agent's file reference: JA904421
International filing date: 21 August 2000 (21.08.00)	Priority date: 20 August 1999 (20.08.99)
Applicant: NAGAMORI, Seishi	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
16 January 2001 (16.01.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年3月1日 (01.03.2001)

PCT

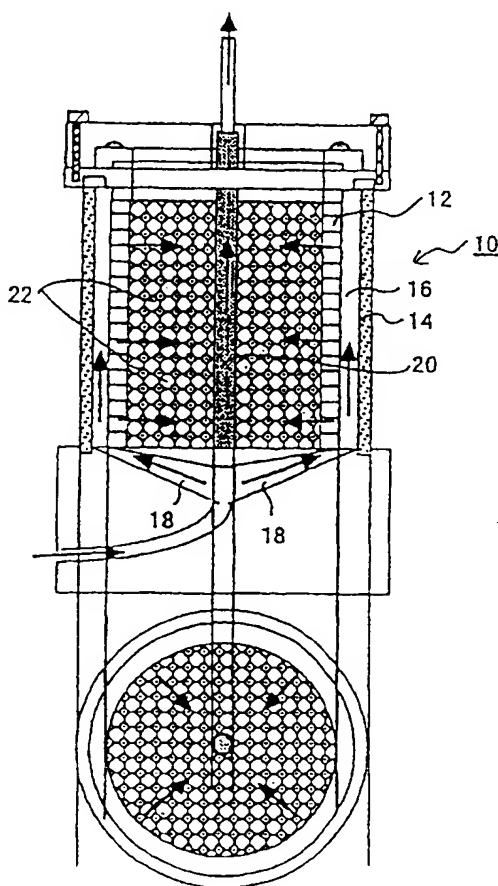
(10) 国際公開番号
WO 01/14517 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12M 3/00, C12N 7/00 (71) 出願人 および
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/05582 (72) 発明者: 永森 静志 (NAGAMORI, Seishi) [JP/JP]; 〒105-0014 東京都港区芝3-42-3 Tokyo (JP).
(22) 国際出願日: 2000年8月21日 (21.08.2000) (74) 代理人: 佐伯 憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo (JP).
(25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): JP, KR, US.
(26) 国際公開の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) 優先権データ: 特願平11/233647 1999年8月20日 (20.08.1999) JP (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 宮村 達男 (MIYAMURA, Tatsuo) [JP/JP]; 〒162-8640 東京都新宿区戸山一丁目23番1号 国立感染症研究所内 Tokyo (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR PROLIFERATING HEPATITIS VIRUS

(54) 発明の名称: 肝炎ウイルスの増殖方法及び装置



(57) Abstract: A method for proliferating a hepatitis virus such as HCV and an apparatus therefor. A method of proliferating cells (for example, hepatocytes), which are less adhesive to a carrier, in a large amount over a long time. More particularly, the above method comprises infecting hepatocytes, which are maintained in a radial flow type hepatocyte bioreactor consisting of a main bioreactor unit containing the hepatocytes carried on a particulate porous carrier and a liquid culture medium flown from the periphery of the main bioreactor unit toward the center thereof, with a hepatitis virus; continuously flowing the liquid culture medium from the periphery of the main bioreactor unit toward the center thereof; and thus proliferating the hepatitis virus in the hepatocytes thus infected.

WO 01/14517 A1

[続葉有]



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明は、H C Vなどの肝炎ウイルスの増殖方法、及びその装置に関する。また、本発明は、肝細胞などの担体に接着性の低い細胞を長期にかつ大量に増殖する方法に関する。

より詳細には、本発明の方法は、粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させる方法に関する。

明 細 書

肝炎ウイルスの増殖方法及び装置

技術分野

本発明は、C型肝炎ウイルス（HCV）等の肝炎ウイルスの増殖方法及びその装置に関する。

背景技術

HCVは1989年にcDNAがクローニングされ、その後各種発現系を駆使してその構造及びプロセッシング機構が明らかにされてきた。その結果、非常に有効な診断系が開発され、我が国におけるHCVによる輸血後肝炎は現時点ではほぼ制圧された。

以上のように、HCVの全容は明らかになりつつあるが、遺伝子レベルの研究が先行し、未だにウイルスの複製、粒子形成、変異等の生物学及び発癌機構の解明などの基礎的な研究は進んでおらず、HCVのワクチン、プロテアーゼ阻害剤、アンチセンス等の薬剤による治療法の開発も進展していない。これは、生体外におけるHCVの増殖系が未だに存在しないことに起因する。HCVを培養肝細胞中で増殖させることは非常に困難なことであり、未だかつてこれに成功したという報告はない。従って、現在、上記の研究にはチンパンジーを用いるしか方法がない。しかし、これは非常に高価であり、個体差や再現性にも問題がある。また、動物愛護の点からもその利用には限界がある。このような背景から、臨床治験や動物実験に依存しない培養細胞を用いたHCV等の肝炎ウイルスの増殖系の確立が望まれている。

発明の開示

従って、本発明の目的は、培養肝細胞を用いた、HCV等の肝炎ウイルスの増殖方法を提供することである。また、本発明は、肝細胞などの接着性に低い細胞を生体外で3次元的に長期にかつ大量に培養する方法を提供するものである。さ

らに、本発明は、H C Vなどの肝炎ウイルスの増殖方法を提供するものである。

本発明者は、鋭意研究の結果、肝細胞を担持させた担体を収容した培養器に培養液を流通させる培養装置、例えばラジアルフロー型バイオリアクター内で肝細胞を培養し、これにH C Vを感染させ、肝細胞の培養を継続することによりH C V等の肝炎ウイルスを増殖させることが可能であることを見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、肝細胞などの接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させることからなる、接着性の低い細胞を長期にかつ大量に、さらに効率的に増殖する方法に関する。また、本発明は、肝細胞などの接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させ、培養されている細胞に肝炎ウイルスを感染させることからなる肝炎ウイルスの増殖方法に関する。

より詳細には、本発明は、肝細胞を担持させた担体を収容した培養器の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させる培養装置で培養されている肝細胞に肝炎ウイルスを感染させることからなる肝炎ウイルスの増殖方法に関する。また、本発明は、肝炎ウイルスを増殖させるために装置、本発明の方法により増殖させた肝炎ウイルスに関する。

さらに詳細には、本発明は、粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させることを含む、肝炎ウイルスの増殖方法を提供する。また、本発明は、周縁部から中心部に向けて培養液を流通させることができるバイオリアクター本体と、該バイオリアクター本体の周縁部に培養液を供給する培養液供給路と、該バイオリアクター本体の内部に収容され、その上に肝細胞が担持される粒子状の多孔性担体と、該バイオリアクター本体の内部に位置し、培養液をバイオリアクター本体から排出する培養液排出路とを具備したラジアル

フロー型肝細胞バイオリアクターから成る肝炎ウイルスの増殖装置を提供する。

本発明の肝炎ウイルスとしては、肝臓の細胞に感染して増殖可能なウイルスであればよく、HCV、HBV、HEVなどのいわゆる肝炎ウイルスや、肝細胞に感染するデング熱ウイルスなどが好ましい。また、本発明の接着性の低い細胞としては、培養器の担体に接着性が低く、従来技術では担体上で3次元的な培養が困難であるとされていた細胞であり、例えば肝細胞などが好ましい。

本発明の方法によれば、排出される培養液中に増殖されたHCVなどの肝炎ウイルスを得ることができる。このように、本発明は、培養細胞を用いて、生体外でHCVなどの肝炎ウイルスを効率良く増殖させる方法を初めて提供するものである。

従って、本発明は、従来治療に用いられてきたインターフェロンの効果予測はもちろん、HCVなどの肝炎ウイルスワクチンの開発、抗HCV抗体の調製、プロテアーゼ阻害剤、ポリメラーゼ阻害剤やアンチセンス薬剤等のHCVなどの肝炎ウイルスの治療薬の開発等に大いに貢献するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の方法に用いられる培養装置の例としてのラジアルフロー型バイオリアクターの縦断面及び横断面を示す図である。

第2図は、本発明の培養システムの例を模式的に示す図である。

第3図は、血清添加培養液を用いた培養系における、温度(℃)、酸素濃度(ppm)及びアルブミン濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)の推移(第3図(A))、排出培養液中のHCVの検出の結果(第3図(B))、及び培養液中のGPT(IU/l)、GOT(IU/l)、及びLDH(IU/l)の推移(第3図(C))を示したものである。

第3図(A)の白丸印(○)は温度(℃)を示し、黒丸印(●)は酸素濃度(ppm)を示し、白四角印(□)はアルブミン濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)を示す。温度(℃)、及び酸素濃度(ppm)は左側の目盛りで示され、アルブミン濃度($\mu\text{g}/\text{ml}$)は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第3図(B)の白丸印(○)はRNA力価(\log_{10} コピー数/ml)を示し、白

四角印 (□) は H C V - コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印 (■) は H C V - コア蛋白質が陽性であることを示し、横軸は培養日数である。

第 3 図 (C) の黒丸印 (●) は G P T (I U / l) を示し、白丸印 (○) は G O T (I U / l) を示し、白四角印 (□) は L D H (I U / l) を示す。G P T (I U / l) 、及び G O T (I U / l) は左側の目盛りで示され、L D H (I U / l) は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第 4 図は、無血清培養液を用いた培養系における、温度 (℃) 、及び酸素濃度 (p p m) の推移 (第 4 図 (A)) 、排出培養液中の H C V の検出の結果 (第 4 図 (B)) 、及び培養液中の G P T (I U / l) 、G O T (I U / l) 、及び L D H (I U / l) の推移 (第 4 図 (C)) を示したものである。

第 4 図 (A) の白丸印 (○) は温度 (℃) を示し、黒丸印 (●) は酸素濃度 (p p m) を示す。横軸は日数を示している。

第 4 図 (B) の白丸印 (○) は R N A 力価 (log₁₀ コピー数 / m l) を示し、白四角印 (□) は H C V - コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印 (■) は H C V - コア蛋白質が陽性であることを示し、横軸は培養日数である。

第 4 図 (C) の黒丸印 (●) は G P T (I U / l) を示し、白丸印 (○) は G O T (I U / l) を示し、白四角印 (□) は L D H (I U / l) を示す。G P T (I U / l) 、及び G O T (I U / l) は左側の目盛りで示され、L D H (I U / l) は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第 5 図は、無血清培養液を用いた培養系で、培養時にタイプ 1 a の感染性クロン R N A をバイオリアクターにトランスフェクションした場合における、温度 (℃) 、酸素濃度 (p p m) 及びアルブミン濃度 (μ g / m l) の推移 (第 5 図 (A)) 、排出培養液中の H C V の検出の結果 (第 5 図 (B)) 、及び培養液中の G P T (I U / l) 、G O T (I U / l) 、及び L D H (I U / l) の推移 (第 5 図 (C)) を示したものである。

第 5 図 (A) の白丸印 (○) は温度 (℃) を示し、黒丸印 (●) は酸素濃度 (p p m) を示し、白四角印 (□) はアルブミン濃度 (μ g / m l) を示す。温度 (℃) 、及び酸素濃度 (p p m) は左側の目盛りで示され、アルブミン濃度 (μ g / m l) は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第5図(B)の白丸印(○)はRNA力価(\log_{10} コピー数/ml)を示し、白四角印(□)はHCV-コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印(■)はHCV-コア蛋白質が陽性であることを示し、横軸は培養日数である。

第5図(C)の黒丸印(●)はGPT(IU/l)を示し、白丸印(○)はGOT(IU/l)を示し、白四角印(□)はLDH(IU/l)を示す。GPT(IU/l)、及びGOT(IU/l)は左側の目盛りで示され、LDH(IU/l)は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

第6図は、トランスフェクション後96日目の培養液を蔗糖勾配法にて分画して、それぞれの分画のHCV RNAとHCVのコア蛋白質を測定した結果を示す。第6図の下段のグラフの白丸印(○)はHCV RNAの力価(\log_{10} コピー数/ml)を示し、黒丸印(●)はHCVコア蛋白質の濃度(pg/ml)を示し、第6図の上段のグラフの黒四角印(■)はコア蛋白質の密度(g/ml)を示す。

第7図は、感染性クローンH77をトランスフェクション後8、44日目の培養液を、RNaseでの処理、及びnest-RT PCR法で検出した結果を示す図である。第7図は左側から、培養前日(-1日)の培養液、培養8日目の培養液、培養44日目の培養液、対照としての血清、対照としてのRNAであり、各々、RNase処理無し(RNase-)でnest-RT PCR無し(RT-)、RNase処理無し(RNase-)でnest-RT PCR有り(RT+)、及びRNase処理有り(RNase+)でnest-RT PCR有り(RT+)の3つのレーンで構成されている。第7図の上段の数字は培養日数を示し、+-の表示の上の段はnest-RT PCR処理の有無を有り(+)、無し(-)で示し、下の段はRNase処理の有無を有り(+)、無し(-)で示している。第7図の縦方向の数値は塩基数(mer)を示す。

第8図は、感染性クローンH77をトランスフェクションした後110日目の細胞内にタグを用いたストランド特異的RT-PCR(Strand-specific RT-PCR)法でマイナス鎖RNAを検出した結果を示す図である。第8図のMはマーカーを示し、レーン1のNは細胞(-)で、ネガティブストランドRNA(negative strand RNA)及びポジティブストランドRNA(positive strand RNA)も存在

していないコントロールを示し、レーン 2 の (-) R N A はネガティブストランド R N A (negative strand RNA) を加えた場合を、レーン 3 の (+) R N A はポジティブストランド R N A (positive strand RNA) を加えた場合をそれぞれ示し、レーン 4 の細胞 (C e l l) は R F B で培養した H C V 感染細胞の場合を示す。第 8 図の縦方向の数値は分子量を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法で使用される培養装置としては、肝細胞を担体に担持させ、これを収容した培養器に培養液を流通させ、担持された肝細胞周辺に常に培養液が流通することができる培養装置である。培養液は、培養器のいかなる方向から流通させてもよい。例えば、培養器の周辺部から中心部であってもよいし、下部から上部であってもよく、これらの組み合わせであってもよい。また、肝細胞を担持させる担体としては、培養細胞を担持することができるものであれば特に制限はないが、多孔性の担体が好ましい。担体の材質としてはガラスやプラスチックなどが挙げられる。

本発明の好ましい培養装置として、ラジアルフロー型バイオリアクターが挙げられる。本発明の好ましいラジアルフロー型バイオリアクターの一例を図面に基づいて説明する。

第 1 図には、本発明の好ましいラジアルフロー型バイオリアクターの一例が模式的に示されている。第 1 図の上側の図はラジアルフロー型バイオリアクターの縦断面図であり、下側の図はラジアルフロー型バイオリアクターの横断面図である。ラジアルフロー型バイオリアクター 10 は、円筒状のバイオリアクター本体 (培養器) 12 を含む。バイオリアクター本体 12 の外周壁は多数の貫通孔を有する多孔性材料から成り、これらの貫通孔を通して培養液がバイオリアクター本体の外側から内側に流通できるようになっている。貫通孔の直径は、後述する担体粒子よりも小さく、かつ、バイオリアクター本体 12 内に培養液を十分に供給できる大きさであり、通常 20 ~ 80 μ m 程度が好ましい。断面がバイオリアクター本体 12 と同心円状となるようにバイオリアクター本体 12 のさらに外側を囲包する、円筒状のケーシング 14 が設けられており、バイオリアクター本体 1

2の外周壁と、該ケーシング14との間には、環状の培養液供給路16が形成される。培養液供給路16は、その底部において、培養液供給管18と連通している。バイオリアクター本体12の中心部には、培養液排出管20が設けられている。培養液排出管20の外周壁も、バイオリアクター本体12と同様な大きさの貫通孔を多数有する多孔性材料から成り、培養液は流通できるが、担体は通過できない。

さらに、バイオリアクター本体12の内部には、粒子状の多孔性担体22が多数收容されている。多孔性担体の材料としては、特に限定されないが、好ましい例として球状の多孔性ガラスビーズを挙げることができる。多孔性担体の直径は、特に限定されないが0.1mm～6mm程度が好ましく、特には0.3mm～1.2mm程度が好ましい。また、担体中の孔径は特に限定されないが10～300μm程度が好ましく、特には20～120μm程度が好ましい。また、担体粒子内の空隙率は、特に限定されないが30～70%程度が好ましく、特には40～60%程度が好ましい。このような多孔質ガラスビーズは、ドイツ国ショットグラスベック社（Schott Glasswerk Co. Ltd.）からシラン（Siran）の商品名で市販されており、この市販品を好ましく用いることができる。また、バイオリアクター本体12内に收容される担体粒子の密度は、特に限定されないが、バイオリアクター本体12内に粒子を重力下でできるだけ多量に注ぎ込むことが好ましい。

上記のラジアルフロー型バイオリアクターのサイズは特に限定されず、バイオリアクター本体12内の容積は、通常、5ml～数十リットル程度であるがこの範囲外でも差し支えない。

次に上記のようなラジアルフロー型バイオリアクターを用いた肝細胞の培養方法について説明する。培養液の流れは第1図において矢印で示されている。すなわち、培養液は培養液供給管18を通じてバイオリアクター本体12の外周部にある培養液供給路16に底部から供給される。培養液は、培養液供給路16を上方に向かって流通するが、バイオリアクター本体12の外壁に設けられている多数の貫通孔からバイオリアクター本体12の内部に進入する。そして、バイオリアクター本体12内を中心に向かって流れ、培養液排出管20に設けられた多数の貫通孔から培養液排出管20内に入り、培養液排出管20内を上方に向かって

移動し、培養液排出管 20 の頂部からバイオリアクター本体 12 の外部に排出される。なお、第 1 図に示されるラジアルフロー型バイオリアクターでは、培養液は底部から供給されるが、バイオリアクター本体 12 の外周部から中心部に向かって培養液が流れればよいので、培養液を培養液供給路 16 の頂部から供給する構成としてもよい。また、排出された培養液の一部は再度循環させて培養液として供給することが好ましい。すなわち、培養液としては、新鮮な培養液と、リサイクルされた培養液の混合物を用いることが好ましい。これらの混合割合は、一日のグルコース消費量 (g/日) / 酸素消費量 (g/日) 比率が 0.5 ~ 1.5、特に 3 ~ 10 程度になるように自動制御することが好ましい。

ここで使用される培養液は、肝細胞を培養し増殖させることができるものであればどのような組成のものでもよく、無機質、糖、アミノ酸、ペプチド、ビタミン類、有機酸、核酸、pH 調整剤、酸素などの細胞の培養に必要な成分を含有するものであればよい。例えば、無機質としては、 NaCl 、 KCl 、 MgCl_2 、 MgSO_4 、 NaH_2PO_4 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ などが挙げられ、アミノ酸、ペプチドとしては、L-アスパラギン塩酸塩、L-アラニン、アラニル-L-グルタミン、L-アスパラギン酸、L-グルタメート、グリシン、グリシル-L-グルタミン、L-イソロイシン、L-リジン、L-フェニルアラニン、L-セリン、L-オルニチン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、インシュリンなどが挙げられ、糖としては、糖や糖アルコール、配糖体などが挙げられ、例えばD-グルコース、D-マンノース、D-ガラクトース、イノシトールなどが挙げられる。有機酸としては、遊離の酸又はエステルなどの有機酸誘導体が挙げられ、例えばコハク酸、コリンニ酒石酸 (choline bitartrate)、葉酸、ビルビン酸ナトリウム、グリセロリン酸などが挙げられる。ビタミン類としては、塩酸ピリドキサル、リボフラビンなどが挙げられる。核酸としては、ウリジンなどが挙げられる。pH 調整剤としては、 NaOH 、炭酸ガス、 NaHCO_3 などが挙げられる。

培養液としては、市販の培養液を用いることもできる。また、これに 1 ~ 3 % 程度の、ウシ胎児血清等の血清を添加したものも好ましく用いることができる。培養液中の酸素濃度及び pH を調整することが好ましい。培養液中の酸素濃度は

排出培養液中の酸素濃度が、1 ppm以上となるように調整することが好ましい。すなわち、バイオリアクター本体（培養器）の容積1 ml当たり、酸素供給量は0.025～0.75 ml/分、特に0.05～0.5 ml/分程度が好ましい。また、新鮮な培養液の供給速度は、特に限定されないが、バイオリアクター本体（培養器）の容積1 ml当たり、通常、0.25～100 ml/日程度、好ましくは0.5～50 ml/日程度である。また、培養液の循環速度は、特に限定されないが、バイオリアクター本体（培養器）の容積1 ml当たり、通常、0.25～2.0 L/日、好ましくは0.5～1.0 L/日程度である。培養液のpHは、水酸化ナトリウム溶液や二酸化炭素等を用いて約7.0に調整することが好ましい。さらに、培養液の温度は、約37℃又はそれ以下に調整することが好ましい。

肝細胞は、上記した多孔性担体の表面及び多孔性担体中の孔の内部表面に付着して増殖する。増殖した肝細胞は、多孔性担体の表面及び孔の内部表面に担持され、さらに多孔性担体間の空隙にも充填される。肝細胞の多孔性担体への付着及び増殖は、培養液中に肝細胞を添加した、肝細胞浮遊液を上記培養液としてラジアルフロー型バイオリアクター内に供給することにより達成することができる。肝細胞浮遊液を培養液として供給すると、培養液が多孔性担体と接触しながら流通していく間に肝細胞が多孔性担体の表面又はその孔の内部表面に付着し、そこで増殖する。

培養開始時に培養液に添加する肝細胞の密度は、特に限定されないが、通常 $10^5 \sim 10^9$ 細胞/ml程度、好ましくは $10^6 \sim 10^7$ 細胞/ml程度であり、また、培養液に添加する肝細胞の総数は、バイオリアクター本体の容積に応じて適宜選択されるが、例えばバイオリアクター本体12内の容積が200 mlの場合には通常 $10^7 \sim 10^{10}$ 個程度、好ましくは $10^8 \sim 10^9$ 個程度が適当である。なお、肝細胞を添加した培養液がバイオリアクター本体内に行き渡った後、3時間～12時間程度は、培養液の流通を止め、肝細胞のバイオリアクター本体からの流出を防いで肝細胞の担体上への付着を促進することが好ましい。

用いる肝細胞は、剖検等によりヒトの肝臓から採取したものを公知の平板培養法等により培養して増殖させたものであってもよいが、長期間にわたって確実に

バイオリアクター内での増殖、維持を達成するために肝細胞の樹立細胞株を用いることが好ましい。肝細胞の樹立細胞株自体は公知であり、いずれの細胞株をも用いることができる。好ましい細胞株の例として、FLC-4（米国特許第5,804,441号、FERM BP-5165の受託番号で生命工学工業技術研究所に寄託）、HepG2（ATCCより入手可能）、Huh7（Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB)より入手可能）、FLC-1、FLC-2、FLC-3、FLC-5、FLC-6及びFLC-7（これらFLCシリーズの株細胞は、K. Fujise, S. Nagamori, H. Kameda et al., HEPATOLOGY, 8: 1425, 1988 ; 永森静志, 他, HUMAN CELL 1(1):106,115-118,120,123, 1988 ; 永森静志ほか、カレントセラピー 16:158-162,1998 ; Kawada, M. et al., In Vitro Cell Dev. Biol., 34:109-115,1998 ; 及び、蓮村 哲 ほか、人工血液, 5, 33-37, 1997等を参照）等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。本発明者が、複数種類の肝細胞株について、HCVの増殖性を比較検討したところ、FLC-4細胞中でHCVが最も良く増殖したので、FLC-4細胞を用いることが好ましい。FLC-4細胞中には、HCVのミニジーンRNAを特異的に安定化させ翻訳効率を上昇させる何らかの宿主因子が存在すると考えられる。

肝細胞を供給後、通常5～15日間培養すると、肝細胞が十分に増殖して肝炎ウイルスを感染させるのに好ましい状態となる。肝細胞は、バイオリアクター本体内で約 10^8 細胞/ml以上にまで増殖する。バイオリアクター本体12内の容積が200mlの場合に、肝細胞は総数で約 2.9×10^{10} まで増殖する。

肝細胞を増殖後、肝炎ウイルスを感染させる。本発明の方法により、A型、B型、C型、D型、E型、G型のようないずれの肝炎ウイルスをも増殖させることができ、特にHCVが好ましい。本発明の方法によれば、異なる型や、同じ型の異なる株系の複数のウイルスを同時に増殖させることも可能である。肝炎ウイルスの感染は、例えば慢性肝炎患者の血清を供給培養液中に含めて培養液として供給することにより行うことができる。肝炎ウイルスを含む培養液を、バイオリアクター本体内の肝細胞に直接添加することにより感染の可能性をより高めることができる。供給する肝炎患者血清の量としては、特に限定されないが、バイオリアクター本体の容積の $1/50 \sim 1/10$ 程度が適当である。あるいは、肝炎ウ

ウイルスを肝細胞内で構築することができる、肝炎ウイルスの感染性 cDNA クローンを注入することもできる。従って、本発明において「肝炎ウイルスを感染させる」ことには、完全な肝炎ウイルス粒子を感染させることのみならず、肝細胞内で肝炎ウイルスを構築できる核酸を発現する、感染性を有する組換えベクターを感染させることも包含される。なお、肝炎ウイルス含有培養液を供給した後、好ましくは 2 時間～24 時間程度、さらに好ましくは 2～10 時間程度は、新たな培養液の供給及び培養液の循環を停止し、さらにその後好ましくは 2 時間～48 時間程度、さらに好ましくは 6～48 時間程度は新たな培養液の供給を行わずにバイオリアクター本体 12 の頂部から排出された培養液を再度バイオリアクター本体 12 に培養液として供給することが好ましい。このようにすることにより肝炎ウイルスが感染する可能性を高めることができる。また、肝炎ウイルスを感染させる直前 15 分間～4 時間程度、さらに好ましくは 30 分間～2 時間程度、それまでの新鮮培地供給速度及び酸素供給速度を 1.5 倍～4 倍程度、さらに好ましくは 1.5 倍～2.5 倍程度に増加させて培養することが好ましい。このようにすることにより肝炎ウイルスが感染する可能性を高め、かつ細胞の状態を良好に保つことができる。また、肝細胞の培養開始後、酸素消費量がバイオリアクター本体の容積の半分の $\text{ppm} \pm 30\%$ （例えば、バイオリアクター本体内の容積が 30 ml の場合には $15 \text{ ppm} \pm 30\%$ ）程度になった時点で培養温度を徐々に下げ、酸素消費量が安定した後上記のようにウイルスを感染させることがウイルス感染の確率を高める上で好ましい。この際、培養温度は $28^{\circ}\text{C} \sim 34^{\circ}\text{C}$ が好ましく、さらに好ましくは $29^{\circ}\text{C} \sim 32^{\circ}\text{C}$ 程度である。また、ウイルス感染後の培養も、このような低温下で行うことが、ウイルス感染を持続し、細胞の状態を良好に保つ上で好ましい。

上記の肝炎ウイルス感染処理後、上記した条件で肝細胞の培養を続けることにより、肝炎ウイルスが肝細胞内で増殖し、感染後 2～3 週間程度で培養液排出管 20 から排出される培養液中に肝炎ウイルスが含まれるようになる。従って、排出される培養液から肝炎ウイルスを回収することにより肝炎ウイルスを分離することができる。培養液からの肝炎ウイルスの分離は、限外ろ過膜を用いたろ過や、遠心分離、ゲルろ過クロマトグラフィー等の常法により行うことができる。

本発明の方法は、肝細胞などの接着性の低い細胞であっても、これを生体内に存在すると同様な３次元的に展開し、長期にかつ大量に培養できることを開示するものである。したがって、本発明は、接着性の低い細胞を３次元的に長期にかつ大量に培養する方法を提供するものである。

また、本発明の方法は前記してきたHCVに限らず、HBVやHEVなどの肝炎ウイルス、肝細胞でのデング熱ウイルスなどにも適用することができる。

本発明の方法により増殖されたウイルスは、ワクチンの開発や、抗肝炎ウイルス抗体を誘導するための免疫原として利用することができる。また、上記した培養肝細胞中での肝炎ウイルスの増殖系は、肝炎ウイルスの回収のみならず、プロテアーゼ阻害剤やアンチセンスRNA若しくはアンチセンスDNA等の肝炎治療薬の開発に利用することも可能である。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例 1

(1) ラジアルフロー型バイオリアクター

第1図に示す構造を有するラジアルフロー型バイオリアクターを準備した。バイオリアクター本体12及び培養液排出管20は、直径約40 μ mの貫通孔を有する多孔性の金属焼結材料から成るものであった。バイオリアクター本体12内の容積は30mlであった。バイオリアクター本体12内に充填した多孔性担体は、多孔性ガラスビーズ（商品名Siran, ドイツ国Schott Glasswerk Co. Ltd.）であった。このガラスビーズの直径は0.6mm、内部は蜂巢状に孔が空いており、空隙率は50%、表面積は90m²/L-matrix、孔径は20²～120 μ mであった。このようなガラスビーズをバイオリアクター本体12内に18g充填した。従って、細胞接着面積は1500cm²/g-matrixであった。

(2) 培養システム

前記(1)のラジアルフロー型バイオリアクターを含む培養システムの概要を

第2図に模式的に示す。第2図に示すシステムにおいて、新鮮な培養液は新鮮培養液貯蔵容器24内に蓄えられており、ポンプ26により培養液調整槽28内に移送される。培養液調整槽28には攪拌機30が備えられており、ここで培養液の酸素濃度、二酸化炭素濃度及びpHが調整される。なお、培養液調整槽28を載せている台31には加熱手段が設けられており、培養液の温度を調整することができる。NaOH貯蔵容器32内には1N NaOH溶液が蓄えられており、必要に応じてポンプ34により培養液調整槽28内に移送され、培養液のpHが調整される。一方、酸素ポンプ36及び二酸化炭素ポンプ38が流量コントローラ40を介して培養液調整槽28に接続されている。酸素ポンプ36及び二酸化炭素ポンプ38から、それぞれ酸素及び二酸化炭素が必要量だけ培養液調整槽28に供給される。流量コントローラ40はマイクロコンピュータ42に接続されており、該マイクロコンピュータにより、流量が20分に一度の割合でチェックされ、制御される。培養液調整槽28内で酸素濃度、二酸化炭素濃度及びpHが調整された培養液は、ポンプ44によりラジアルフロー型バイオリアクター10に底部から供給される。供給された培養液は、第1図に基づいて説明したように、ラジアルフロー型バイオリアクター10の培養液排出管の頂部から排出される。排出された培養液はポンプ46により排出培養液貯蔵容器48に蓄えられる。なお、第2図に示す培養システムでは、排出された培養液を培地調整槽28に戻す経路も設けられており、排出培養液の全部又は一部を、必要に応じて培養液として再度供給することも可能な構成となっている。なお、図示してはいないが、マイクロコンピュータ42は、各ポンプと接続され、また、バイオリアクター本体に供給される培養液を測定する図示しない酸素濃度計及び排出された培養液の酸素濃度を測定する図示しない酸素濃度計とも接続され、さらに培養液調整槽28内に備えられた図示しないpHメーター及び温度計とも接続されており、培養液の酸素濃度、pH、温度、培養液の供給量はマイクロコンピュータ42により自動制御される。

(3) 肝細胞の播種及び培養

樹立肝細胞株である上記FLC-4株を 2×10^9 個までフラスコ内で継代培養した。培養液をバイオリアクター本体内に流通させた後、フラスコ内で培養した

FLC-4細胞を培養液に加え、バイオリアクター本体内に供給することにより肝細胞の播種を行った。播種後6時間は、ポンプ44及び46を停止して細胞のバイオリアクター本体からの流出を防いだ。その後は、25ml/日の流量で新鮮な培養液を供給した。また、培養液の循環速度は10～40L/日であった。培養液のpHは7.0、温度は37℃、酸素濃度は排出培養液中の酸素濃度が1～6ppmとなるようにコンピューターにより自動制御した。

培養液は市販の次の組成（単位は全てmg/L）を有するものである。

NaCl	6000、	KCl	400、
MgCl ₂	100、	MgSO ₄	98、
NaH ₂ PO ₄	125、	FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.8、
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.01、	CuSO ₄ ・5H ₂ O	0.001、
D-グルコース	2000、	D-マンノース	500、
L-アスパラギン塩酸塩	200、	D-ガラクトース	200、
L-アラニン	20、	アラニル-L-グルタミン	500、
L-アスパラギン酸	20、	L-グルタメート	20、
グリシン	30、	グリシル-L-グルタミン	500、
L-イソロイシン	105、	L-リジン	146、
L-フェニルアラニン	67、	L-セリン	80、
L-オルニチン	100、	L-スレオニン	95、
L-トリプトファン	25、	L-チロシン	64、
L-バリン	94、	コハク酸	106、
ウリジン	5、	コリン二酒石酸	20、
葉酸	4、	イノシトール	20、
塩酸ピリドキサール	4、	リボフラビン	0.4、
ビルビン酸ナトリウム	110、	グリセロリン酸	1500、
HEPES	1200、	NaHCO ₃	1800、
ヒトトランスフェリン	5、	インシュリン	5、
フェノールレッド	5、		

これにウシ胎児血清を2%添加したものをを用いた。培養液中の酸素やグルコース

消費量の増加により、細胞の活動性が確認され、順調に酸素消費量の増大が認められた。なお、ここで、酸素消費量は、バイオリアクター本体12に供給される培養液中の酸素濃度と、バイオリアクター本体12の頂部から排出される培養液中の酸素濃度との差から求めた。また、グルコース消費量は、排出された培養液中のグルコース濃度を市販のグルコース濃度測定キットを用いて測定し、この濃度と供給培養液中のグルコース濃度との差から求めた。

(4) HCVの感染

リアクターによる培養開始7日目に酸素消費量が15ppmに達し、この時点で培養温度を徐々に32℃に下げた。細胞の酸素消費量が安定した培養開始9日目にHCVの感染を行った。HCVの感染を行う前に培養液供給量及び酸素供給量を2倍に増加させて1時間培養した。その後、HCVの感染を行った。HCVの感染は、慢性C型肝炎患者の血清（チンパンジーに対する感染価が5.5CID₅₀/ml）1mlを10mlの培養液に溶解したものを培養液として、バイオリアクター本体頂部直後の培養液循環チューブから分枝し、バイオリアクター本体内に連通する図示しない管からバイオリアクター本体内に供給することにより行った。その後6時間にわたりポンプを停止した。次いで、循環ポンプ44を起動させたが、バイオリアクター10の頂部から排出された培養液の全量を培養液調製槽28に戻し、新たな培地の供給を行うことなく24時間培養した。その後、上記と同様にして（ただし、培養温度は29～32℃）培養を継続した。

(5) 排出培養液中のHCVの検出

HCV感染処理後、上記した通常の場合で培養を再開してから毎日排出培養液中のHCVを常法であるRT-PCRにより検出した。

ここで、逆転写に用いたプライマーの塩基配列は、

AACACTACTCGGCTAGCAGTであり、

また、PCRに用いたプライマーの塩基配列は、第1回目が

CTGTGAGGAAC TACTGTCTT、及び

AACACTACTCGGCTAGCAGTであり、

第2回目が、

TTCACGCAGAAAGCGTCTAG、及び

G T T G A T C C A A G A A A G G A C C C であつた。

また、PCRは、全量を50 μ lとし、変性工程を94℃、45秒間、アニーリング工程を55℃、45秒間、伸長工程を70℃、60秒間として35サイクル行つた。

その結果、感染処理後1～2日は、HCVが検出されたが、その後検出されなくなり、16日目から再度検出されるようになり、感染後19日目に10⁴～10⁵コピー/mlと最大となった。

HCV RNAは、感染後100日間に至るまでずっと検出された。感染処理後1～2日にHCVが検出されたのは、添加したHCVが流出してきたものが検出されたと考えられる。感染処理後3日目から検出されなくなったのは、添加したHCVの流出が終了したものと考えられる。そして、16日目以降に再度検出されるようになったのは、肝細胞に感染したHCVが肝細胞中で増殖し、この増殖したHCVが培養液中に放出されたものと考えられる。

(6) HCVの塩基配列

感染後23日目に検出されたウイルスのHVR(超可変領域、hyper variable region)の塩基配列を調べたところ(次の表1参照)、バイオリアクターで95%と大部分を占めたクローンはもともと患者血清中で55～60%とメジャーなクローンA1と同一であつた。

結果を表1に、輸血例及びチンパンジーの例と比較できるようにして示す。表1中の「RFB(Radial Flow Bioreactor)」が前記実験の結果を示している。なお、配列はアミノ酸の1文字表記の配列で示されている。

表1中の「クローン数」は、ドナー、チンパンジー、及びレシピエントの血清から回収もの、及びRADから回収されたクローン数を示す。血液提供者及びチンパンジーの血清から回収されたクローン数はアイザキらのデータ²によつてゐる。

表1中の「W」は輸血後の週数を示し、「D」は感染後の日数を示す。表1中のアミノ酸配列の上の数字は、HCVのタンパク質におけるアミノ酸の位置を示し、ハイフンは最上段に記載されているアミノ酸と同じであることを示す。

表 1 超可変領域 (HVR) の配列とそのクローン数

種類	H V R の配列	クローン数									
		ドナー		チンパンジー			レシエント		RFB		
		Ex1	Ex2	#1	#2	#3	4W	5W			
384											
A1	HYRVTRGVQGHVSTLTSLFRPGASQK	18	11	1	20	20	2	1	19		
A2	S-----	3	1	0	0	0	0	0	0		
A3	-----L-----	0	1	0	0	0	0	0	0		
A4	-----F-----	0	0	0	0	0	0	0	1		
B1	N-H-----	0	1	0	0	0	0	0	0		
B2	N-H--A--GAFG--Q-----	5	3	19	0	0	0	0	0		
B3	D-H--A--GAFG--Q-----	0	0	0	0	0	0	1	0		
B4	D-H--A--GAF--TL-----	1	0	0	0	0	0	0	0		
B5	N-H--A--GAF--TS-----	0	0	0	0	0	1	0	0		
B6	D-H--A--GAF--TS-----	2	3	0	0	0	0	0	0		
B7	D-H--A--GAFQ--TS-----	0	0	0	0	0	1	0	0		
B8	D-H--A--GAFQ--TS--R	0	0	0	0	0	1	0	0		
B9	D-H--A--GAFH--TS-----	0	0	0	0	0	2	8	0		
B10	D-H--A--C-GAFH--TS-----	0	0	0	0	0	1	0	0		
C1	--H--A--RSV-K-AF-T-P----	1	0	0	0	0	0	0	0		
C2	N-H-----R-A-K--F-T-P----	0	0	0	0	0	1	0	0		
D1	--H-----FK-S-----	0	0	0	0	0	1	0	0		
		30	20	20	20	20	10	10	20		

実施例 2

実施例 1 と条件を変えて同様な実験を行った。

(1) 血清添加培養液での培養系

バイオリアクターは実施例 1 と同じものを用いた。フラスコにて培養した 1×10^9 個の FLC 4 細胞を培地制御槽に播種した。2% 血清添加培地（培養液）50 ml / 日を用いて培養したところ、バイオリアクター内の FLC 4 細胞の酸素消費量は徐々に増加を始め、30 日目には 25 ppm に（第 3 図（A）参照）、105 日目には 35 ppm に達した。経過中、バイオリアクター後方の溶存酸素濃度が 1.0 ppm 未満にならないように、培養温度を 37℃ より徐々に低下させ（第 3 図（A）参照）、105 日目には 30℃ まで下げた。培養液中のアルブミン量は、低温培養でも経過中 75 μ g / ml 以上であり、細胞の活動性は維持されていた。

培養における、温度（℃）、酸素濃度（ppm）及びアルブミン濃度（ μ g / ml）の推移を第 3 図（A）に示す。第 3 図（A）の白丸印（○）は温度（℃）を示し、黒丸印（●）は酸素濃度（ppm）を示し、白四角印（□）はアルブミン濃度（ μ g / ml）を示す。温度（℃）、及び酸素濃度（ppm）は左側の目盛りで示され、アルブミン濃度（ μ g / ml）は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。数値は第 3 図（C）に示されているとおりである。

前記した実施例 1（5）と同様の方法により、排出培養液中の HCV の検出を行った。

その結果を第 3 図（B）に示す。第 3 図（B）の白丸印（○）は RNA 力価（titer）を示し、白四角印（□）は HCV-コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印（■）は HCV-コア蛋白質が陽性であることを示す。第 3 図（B）の縦軸は RNA 力価（ \log_{10} コピー数 / ml）であり、横軸は培養日数である。

第 3 図（C）は、培養液中の GPT（IU / l）、GOT（IU / l）、及び LDH（IU / l）の推移を示す。第 3 図（C）の黒丸印（●）は GPT（IU / l）を示し、白丸印（○）は GOT（IU / l）を示し、白四角印（□）は LDH（IU / l）を示す。GPT（IU / l）、及び GOT（IU / l）は左側の目盛りで示され、LDH（IU / l）は右側の目盛りで示されている。横軸

は日数を示している。

(2) 無血清培養液での培養系

無血清培地（培養液）50 ml / 日を用いてFLC4細胞をバイオリアクターで培養した。

結果を第4図及び第5図に示す。第5図は、タイプ1aの感染性クローンRNAをバイオリアクターにトランスフェクションした場合（下記の（4）参照）のものである。

培養における、温度（℃）、酸素濃度（ppm）及びアルブミン濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の推移を第4図（A）及び第5図（A）に示す。但し、第4図（A）にはアルブミン濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）は示されていない。第4図（A）及び第5図（A）の白丸印（○）は温度（℃）を示し、黒丸印（●）は酸素濃度（ppm）を示し、第5図（A）の白四角印（□）はアルブミン濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を示す。温度（℃）、及び酸素濃度（ppm）は左側の目盛りで示され、アルブミン濃度（ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。数値は第4図（C）又は第5図（C）に示されているとおりである。

前記した実施例1（5）と同様の方法により、各排出培養液中のHCVの検出を行った。

その結果を第4図（B）及び第5図（B）に示す。第4図（B）及び第5図（B）の白丸印（○）はRNA力価（titer）を示し、白四角印（□）はHCV-コア蛋白質が陰性であることを示し、黒四角印（■）はHCV-コア蛋白質が陽性であることを示す。第4図（B）及び第5図（B）の縦軸はRNA力価（log₁₀コピー数/ml）であり、横軸は培養日数である。

第4図（C）及び第5図（C）は、培養液中のGPT（IU/l）、GOT（IU/l）、及びLDH（IU/l）の推移を示す。第4図（C）及び第5図（C）の黒丸印（●）はGPT（IU/l）を示し、白丸印（○）はGOT（IU/l）を示し、白四角印（□）はLDH（IU/l）を示す。GPT（IU/l）、及びGOT（IU/l）は左側の目盛りで示され、LDH（IU/l）は右側の目盛りで示されている。横軸は日数を示している。

この培養系においては、培養温度は培養開始5日目に35℃に下げて培養し、

100日以上にわたり継代することなしに培養することができた（第5図（A）参照）。その間、細胞の酸素消費量は15～20 ppmで安定していた（第5図（A）参照）。

以上のように、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いて30～35℃の低温で培養することで、無血清培地または2%血清添加培地で、肝細胞癌由来細胞株を100日以上にわたり、継代することなしに培養することができ、その間、酸素消費量、グルコース消費量、アルブミン量等で示される肝細胞の活動性は保たれていた。

（3） 慢性肝炎患者血清による感染実験

実施例1の（4）と同様にして慢性肝炎患者血清を感染させ、実施例1（5）と同様にして排出培養液中のHCVを検出した。その結果、感染後3日目にウイルスRNAは一度陰性になったが、その後再び陽性化し、感染後10日目に $10^3 \sim 10^4$ コピー/mlと最大となった（第4図（B）参照）。

このように、実施例1の場合と同様、接種後一度HCV RNAは陰性になってから再び陽性化し増えてくることから、ウイルスが感染増殖しているものと考えられた。なお、実施例1及び2のいずれの感染実験でも、経過中GOT、GPT、LDH等肝障害の指標の上昇は認められなかった（第4図（C）及び第5図（C）参照）。

（4） 感染性クローンによるトランスフェクション実験

タイプ1aの感染性クローンRNAをバイオリアクターにトランスフェクションしたところ（第5図参照）、ウイルスRNAはトランスフェクション直後から徐々に減少し、44日目には 10^2 コピー/ml未満にまでなったものの、その後57日目に再び 10^4 コピー/mlまで増加し（第5図（B）参照）、100日目まで約 $10^3 \sim 10^4$ コピー/mlと持続していた。なお、トランスフェクションは、感染性クローンH77（Yanagi et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 5;94(16):8738-43）の10 μ gを、リボフェクチン法により、上記した患者血清の場合と同様に、一時的に循環を止めてトランスフェクションした。なお、リボフェクチン法によるトランスフェクションは具体的には次のように行った。

前述のH77よりインビトロでRNAを合成した10 μ gをOptiMEM1

ml にリポフェクチン 150 μ l とともに混合し 15 分間室温に放置した。その後、リアクター内を Opti MEM で十分満たした後、RNA を注入した。

また、培養上清中のコア蛋白も徐々に増加し、44 日目に最大になった（第 5 図（B）参照）。コア蛋白は、免疫測定により定量した。より具体的に記載すると、沈殿試薬により培養液中のウイルス粒子を沈殿分画として収集後、それを分散試薬に分散させる。抗体試薬、および中和試薬で処理した後、HCV コア蛋白がチューブ上の抗 HCV コア蛋白質モノクローナル抗体に結合して、複合体を形成する。未反応物質を洗浄除去した後、ペルオキシダーゼ標識抗 HCV コア蛋白質モノクローナル抗体を加えると、前述のチューブ上の複合体に結合する。未反応物質を洗浄除去した後、HPPA 気質液を添加するとチューブ上に結合したペルオキシダーゼ酵素により蛍光物質が生成され、これを 323 nm の励起光を照射し、生じた蛍光を 410 nm で測定する。これをあらかじめ標準液より作製された検量線から濃度を算定する

さらに、コア蛋白質の存在を確認するために、トランスフェクション後 96 日目の培養液を 200 倍に濃縮し、10～60%（W/W）蔗糖勾配法にて分画して、それぞれの分画の HCV RNA と HCV のコア蛋白質を測定した。

結果を第 6 図に示す。第 6 図の下段のグラフの白丸印（○）は HCV RNA の力価（log₁₀ コピー数/ml）を示し、黒丸印（●）は HCV コア蛋白質の濃度（pg/ml）を示し、第 6 図の上段のグラフの黒四角印（■）はコア蛋白質の密度（g/ml）を示す。

この結果、密度勾配が約 1.07 及び 1.18 g/ml の 2 箇所でもコア蛋白質の極大が測定され、コア蛋白質が 2 峰性の曲線であることがわかった。このことは、培養液中にウイルス粒子が存在していることを示すものである。

また、トランスフェクション後 8、44 日目の培養液を RNase 処理した後に nest-RT PCR で HCV の RNA が検出できたことから、ウイルス粒子内に保護された HCV RNA の存在が示唆された（第 7 図参照）。なお、この nest-RT PCR で用いたプライマーの塩基配列は、フォワード側が CTGTGAGGA ACTACTGTCTT, AACACTACTCGGCTAG CAGT, リバーズ側が TTCACGCAGAAAGCGTCTAG, GTGA

T C C A A G A A A G G A C C C Cであった。

結果を第7図として示す。第7図は左側から、培養前日（-1日）の培養液、培養8日目の培養液、培養44日目の培養液、対照としての血清、対照としてのRNAであり、各々、RNase処理無し（RNase-）でnest-RT PCR無し（RT-）、RNase処理無し（RNase-）でnest-RT PCR有り（RT+）、及びRNase処理有り（RNase+）でnest-RT PCR有り（RT+）の3つのレーンで構成されている。第7図の上段の数字は培養日数を示し、+-の表示の上の段はnest-RT PCR処理の有無を有り（+）、無し（-）で示し、下の段はRNase処理の有無を有り（+）、無し（-）で示している。第7図の縦方向の数値は塩基数（mer）を示す。

さらに、トランスフェクション後110日目の細胞内にタグを用いたRT PCR法でマイナス鎖RNAを検出できたことから、細胞内にウイルス複製中間体の存在が示唆された（第8図参照）。このRT PCRは、具体的には次のように行った。このRT PCRで用いたプライマーの塩基配列は、逆転写反応に、T C T T G G T G G C G A A T A A G C C A T G G C G T T A G T A T, PCR反応にフォワード側が、T C A T G G T G G C G A A T A A, リバーズ側が、C G C G G C A A C A A G T A A Aであった。

結果を第8図に示す。第8図のMはマーカーを示し、レーン1のNは細胞（-）で、ネガティブストランドRNA（negative strand RNA）及びポジティブストランドRNA（positive strand RNA）も存在していないコントロールを示し、レーン2の（-）RNAはネガティブストランドRNA（negative strand RNA）を加えた場合を、レーン3の（+）RNAはポジティブストランドRNA（positive strand RNA）を加えた場合をそれぞれ示し、レーン4の細胞（Cell）はRFBで培養したHCV感染細胞の場合を示す。第8図の縦方向の数値は分子量を示す。この結果、培養された感染細胞中にネガティブストランドRNA（negative strand RNA）の存在が認められた。

培養経過中のHVRの塩基配列をもとの感染性クローンと比較したところ、25、71、106日目にそれぞれ1、2、2個の塩基の変異が認められたが、この培養経過を通して特定の塩基配列をへの収束、変異の蓄積などは認められなかった。結果を次の表2に示す。結果は、表2中の「RFB (Radial Flow Bioreactor)」の欄に示されている。なお、配列はアミノ酸の1文字表記の配列で示されている。

表2中の「クローン数」は、培養液中から回収されたクローン数を示す。

表2中の「D」は感染後の日数を示す。

表2中のアミノ酸配列の上の数字は、HCVのタンパク質におけるアミノ酸の位置を示し、ハイフンは最上段に記載されているアミノ酸と同じであることを示す。

表2 超可変領域 (HVR) の配列と培養液から回収されたクローン数

HVRの配列	クローン数		
	RFB		
	25D	71D	106D
³⁸⁴ ETHVTTGGNAGRTTAGLVGLLTPGAKQN ⁴¹⁰	19	18	18
.....E..	1	0	0
.....I.....	0	1	0
.....D.....	0	1	0
.....R..	0	0	1
.....T...	0	0	1
	20	20	20

以上のように、タイプ1aの感染性クローンをバイオリアクターにトランスフェクションしたところ、1) ウイルスRNAの再増加、2) コア蛋白質の増加、

3) 粒子内ウイルスRNAの存在、4) 細胞内ウイルス複製中間体の存在、5) 塩基配列の変異、の5通りの方法でHCVの複製を確認することに成功した。ウイルス増殖に伴う肝障害については、経過中明らかなGOT、GPT、LDHの上昇などは認められなかった(第5図(C)参照)。

産業上の利用可能性

本発明は、生体外では培養が困難であるとされていた肝炎ウイルスの生体外での培養、増殖方法を初めて提供するものであり、肝炎ウイルスの研究のみならず、肝炎ウイルス感染症の治療、予防、及び機構を研究開発するための材料を提供するものである。より具体的には、ウイルス性肝炎の治療薬の研究開発に必須とされているウイルスを簡便な方法で提供することができる手段を提供するものである。

さらに、本発明の方法は、ウイルスの増殖の機構及び変異の機構を解明するためのウイルスの増殖方法を提供するものである。

このように本発明は、ウイルスの生態の研究のみならず、ウイルス感染症の治療、予防、処置の方法を研究開発のためのウイルスの必要な量を安定に供給する方法を提供するものである。

請 求 の 範 囲

1. 接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させ、培養されている細胞に肝炎ウイルスを感染させて、当該肝炎ウイルスを増殖させることからなる肝炎ウイルスの増殖方法。
2. 担体が、粒子状の多孔性担体である請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 接着性の低い細胞が、肝細胞である請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 接着性の低い細胞が、樹立細胞である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の方法。
5. 肝炎ウイルスが、H C Vである請求の範囲第5項に記載の方法。
6. 担体周縁の培養液の流れが、培養器の外周から中心部への流れである請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の方法。
7. 粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させることを含む、肝炎ウイルスの増殖方法。
8. 前記肝細胞は樹立細胞株である請求の範囲第7項記載の方法。
9. 前記樹立細胞株はF L C - 4 株 (F E R M B P - 5 1 6 5) である請求の範囲第8項記載の方法。
10. 肝炎ウイルスの感染は、前記培養液中に肝炎ウイルスを添加することにより行われ、肝炎ウイルスを培養液に添加後、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させ、次いで、培養液の流通を停止し、次いで、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させて培養する工程を含む請求の範囲第7項ないし第9項のいずれか1項に記載の方法。
11. 肝炎ウイルスを培養液に添加する前に、新鮮な培地の供給速度及び酸素供

給速度をそれまでの速度よりも大きくする請求の範囲第 7 項ないし第 10 項のいずれか 1 項に記載の方法。

12. 前記肝炎ウイルスは C 型肝炎ウイルスである請求の範囲第 7 項ないし第 11 項のいずれか 1 項に記載の方法。

13. 周縁部から中心部に向けて培養液を流通させることができるバイオリアクター本体と、該バイオリアクター本体の周縁部に培養液を供給する培養液供給路と、該バイオリアクター本体の内部に収容され、その上に肝細胞が担持される粒子状の多孔性担体と、該バイオリアクター本体の内部に位置し、培養液をバイオリアクター本体から排出する培養液排出路とを具備したラジアルフロー型肝細胞バイオリアクターから成る肝炎ウイルスの増殖装置。

14. C 型肝炎ウイルスの増殖装置である請求の範囲第 13 項記載の増殖装置。

15. 接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させることからなる、接着性の低い細胞を増殖する方法。

16. 増殖が 3 次元的な増殖である請求の範囲第 15 項に記載の方法。

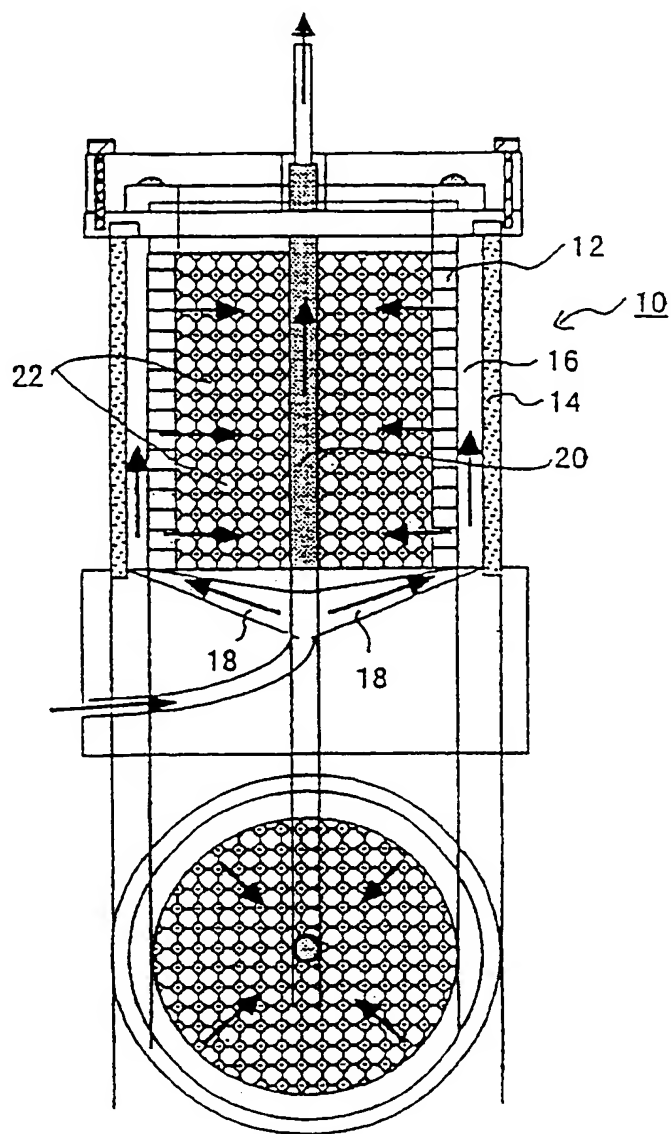
17. 接着性の低い細胞が、肝細胞である請求の範囲第 15 項又は第 16 項に記載の方法。

18. 接着性の低い細胞が、樹立細胞である請求の範囲第 15 項ないし第 17 項のいずれか 1 項に記載の方法。

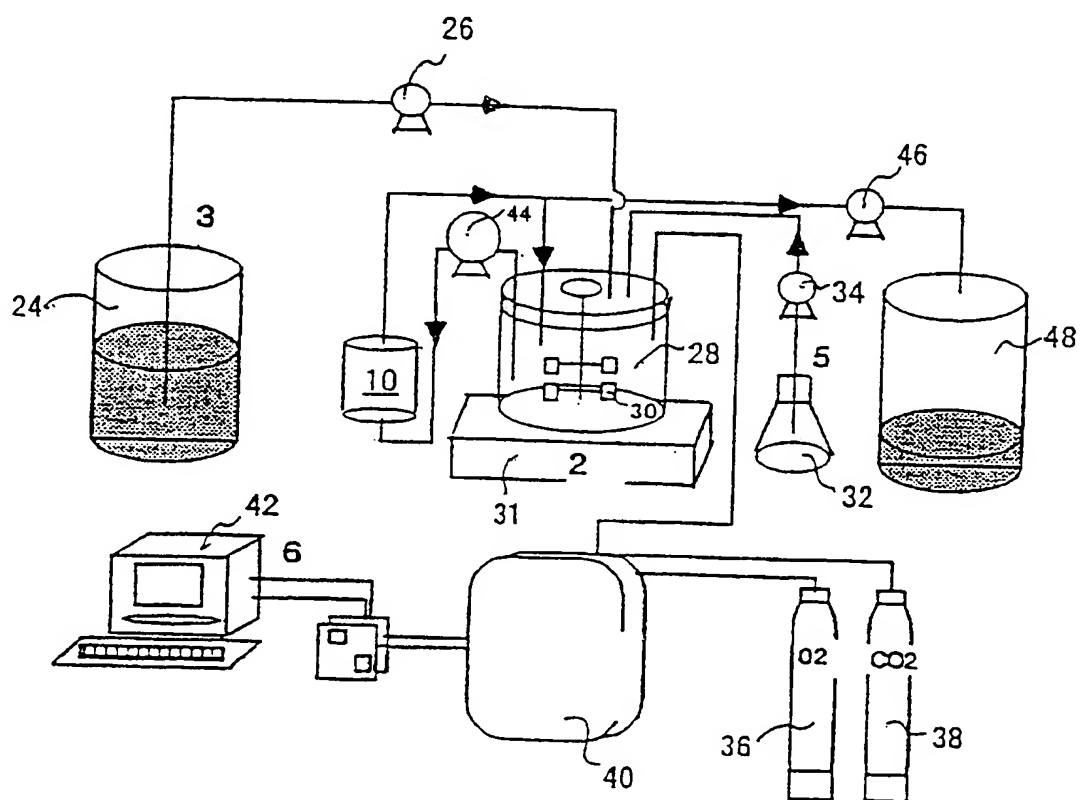
19. 肝炎ウイルスが、HCV である請求の範囲第 15 項ないし第 17 項のいずれか 1 項に記載の方法。

20. 担体周縁の培養液の流れが、培養器の外周から中心部への流れである請求の範囲第 15 項ないし第 19 項のいずれか 1 項に記載の方法。

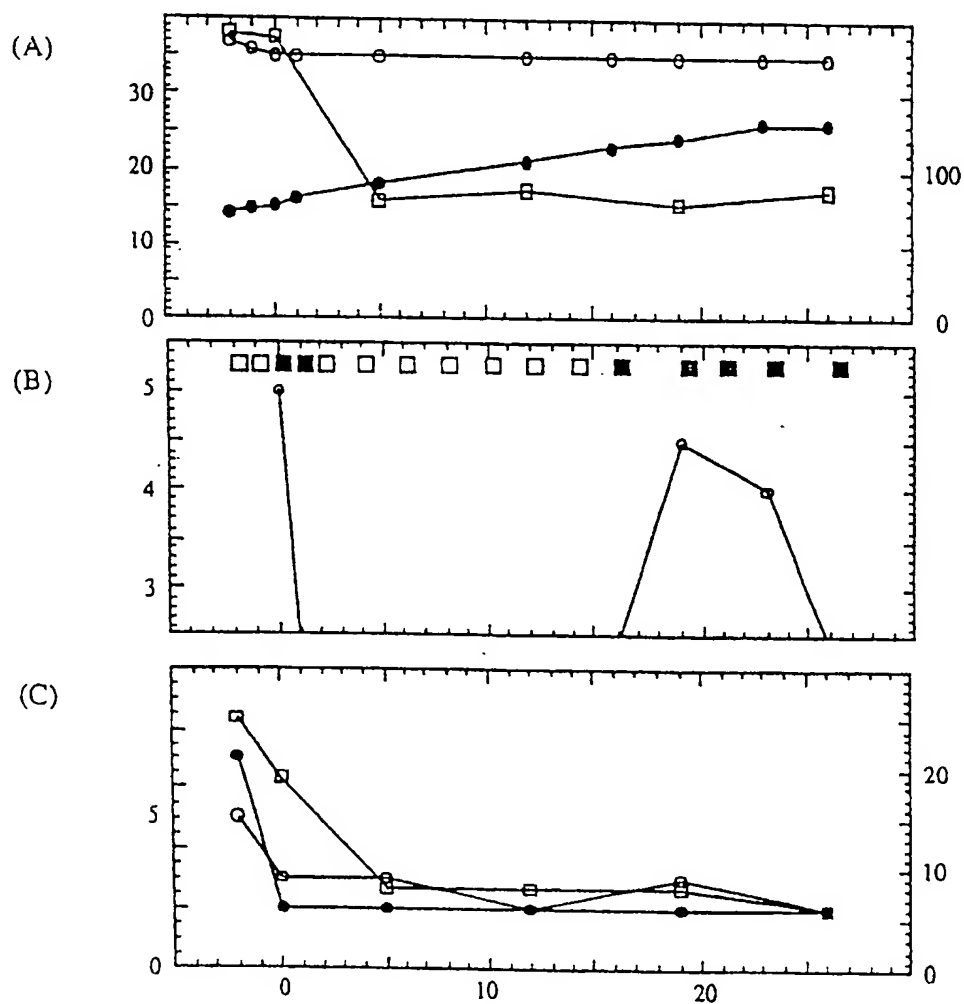
第 1 図



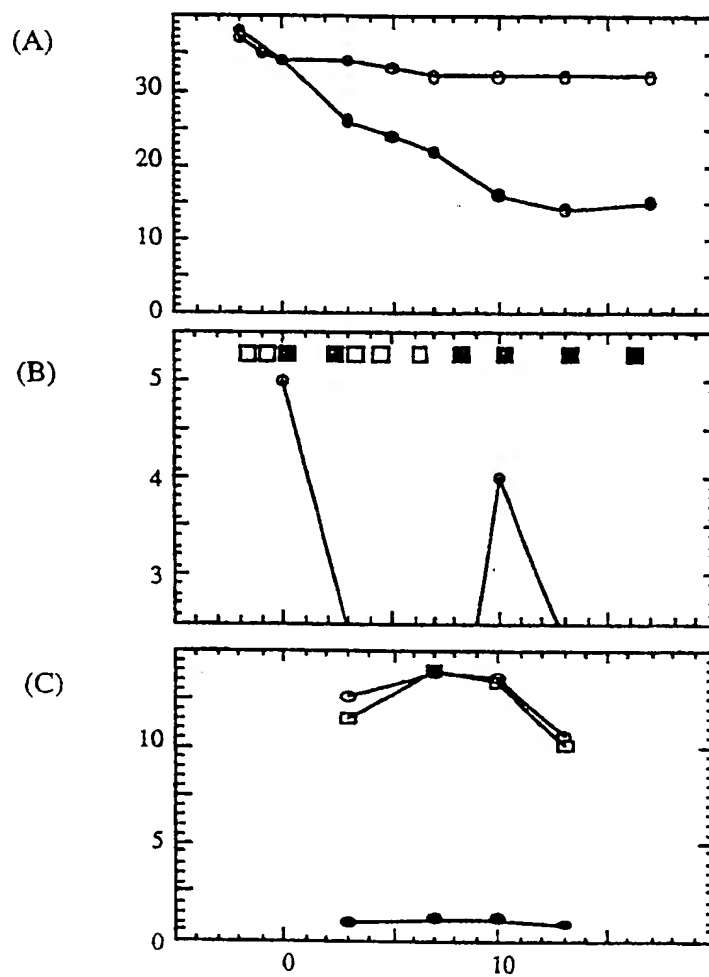
第 2 図



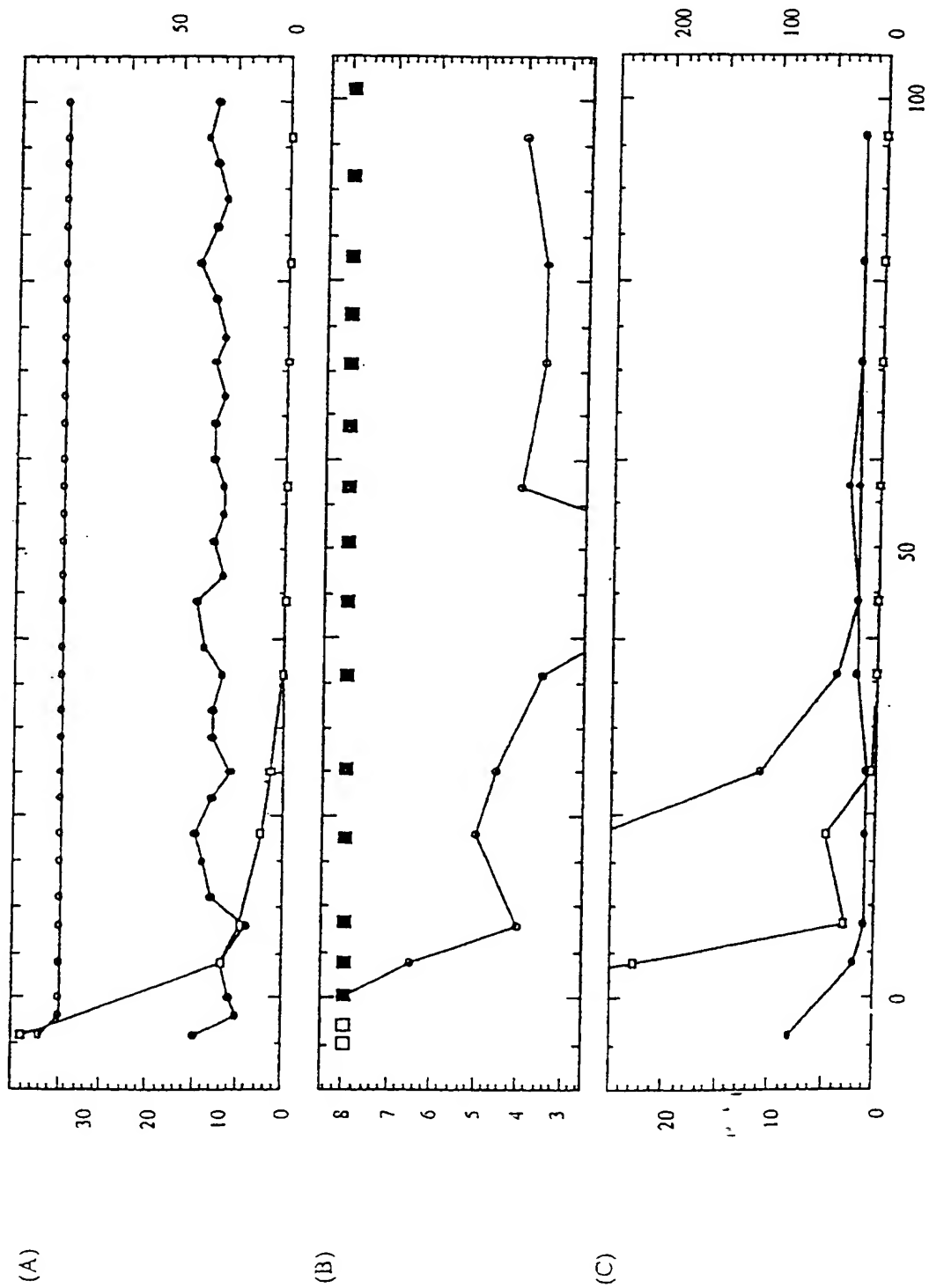
第 3 図



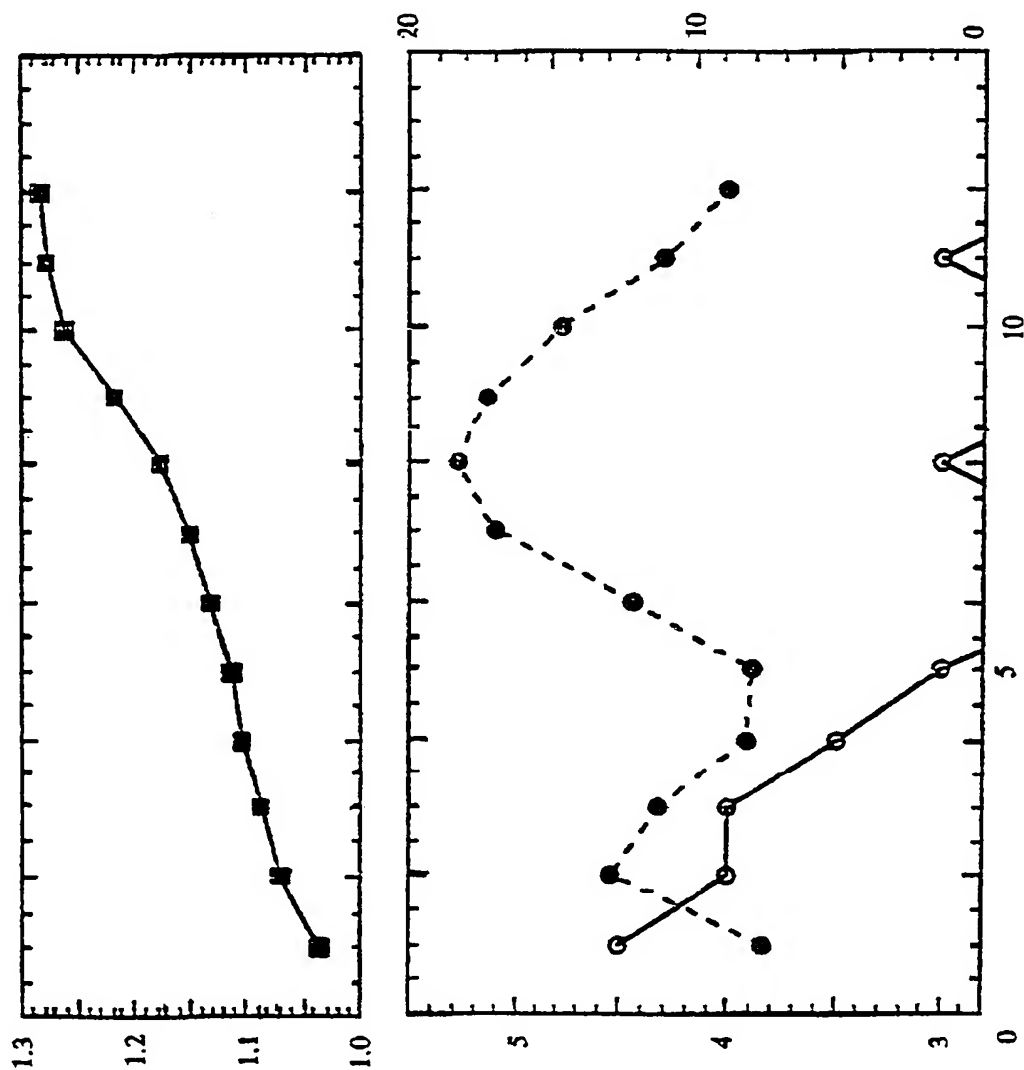
第 4 図



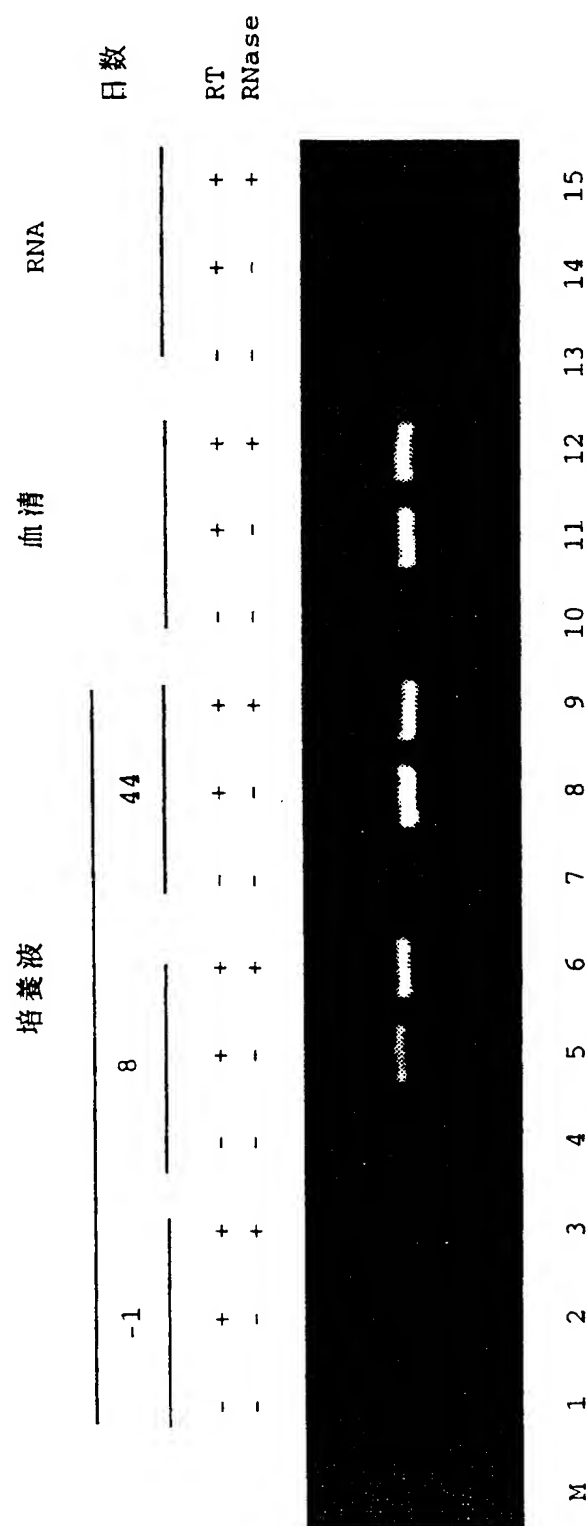
第 5 図



第 6 図

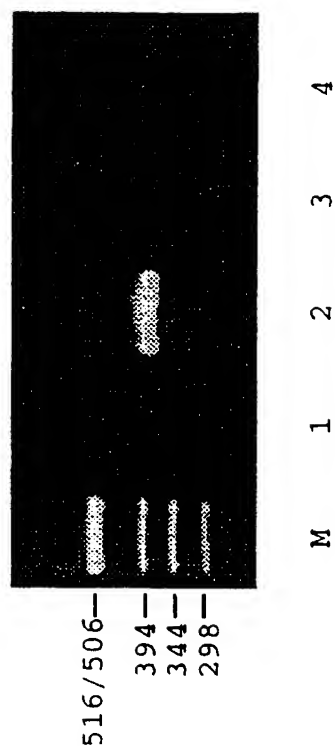


第 7 図



第 8 図

N (-) RNA (+) RNA 細胞



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Seishi NAGAMORI

<120> Method for Proliferating Hepatitis Virus and Apparatus Therefor

<130> JA904421

<150> JP 11-233647

<151> 1999-08-20

<160> 5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for synthesizing cDNA of hepatitis C virus by reverse transcription

<400> 1

aacactactc ggctagcagt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

<400> 2

ctgtgaggaa ctactgtcct 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

<400> 3

aacactactc ggctagcagt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

<400> 4

ttcacgcaga aagcgtctag 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

<400> 5

gttgatccaa gaaaggaccc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12M3/00, C12N7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12M1/00-3/00, C12N7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Kennichi YANAGI et al., "High-density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver," Nippon Kikai Gakkai Netsukougaku Kouenkai Kouen Ronbunshuu, (1997) No.97-25, pp.233-235	15-17 13, 14, 18-20
X Y	EP, 402272, A (TERUMO CORP), 12 December, 1990 (12.12.90) & DE, 69022778, E & JP, 3-15382, A	15-17 13, 14, 18-20
Y	EP, 365313, A (KIRIN BEER KK), 25 April, 1990 (25.04.90) & CA, 2001113, A & US, 5057428, A & DE, 68908835, E & JP, 2-109966, A	13, 14
A	JP, 6-38730, A (Sakai Enetsukusu K.K.), 15 February, 1994 (15.02.94) (Family: none)	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
14 November, 2000 (14.11.00)

Date of mailing of the international search report
28 November, 2000 (28.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12M3/00, C12N7/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12M1/00~3/00, C12N7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	日本機械学会熱工学講演会講演論文集, (1997)No. 97-25, p. 233-235	15-17
Y	Kennichi YANAGI et al. "High-density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver"	13, 14, 18-20
X	EP, 402272, A (TERUMO CORP) 12日. 12月. 1990	15-17
Y	(12. 12. 90) & DE, 69022778, E & JP, 3-15382, A	13, 14, 18-20
Y	EP, 365313, A (KIRIN BEER KK) 25日. 4月. 1990	13, 14
	(25. 04. 90) & CA, 2001113, A & US, 5057428, A & DE, 68908835, E & JP, 2-109966, A	

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 11. 00

国際調査報告の発送日

28.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 6-38730, A (サカイエネックス株式会社) 15日. 2月. 1994 (15. 02. 94) (ファミリーなし)	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05582

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ C12M3/00, C12N7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁷ C12M1/00-3/00, C12N7/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Kennichi YANAGI et al., "High-density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver," Nippon Kikai Gakkai Netsukougaku Kouenkai Kouen Ronbunshuu, (1997) No.97-25, pp.233-235	15-17 13, 14, 18-20
X Y	EP, 402272, A (TERUMO CORP), 12 December, 1990 (12.12.90) & DE, 69022778, E & JP, 3-15382, A	15-17 13, 14, 18-20
Y	EP, 365313, A (KIRIN BEER KK), 25 April, 1990 (25.04.90) & CA, 2001113, A & US, 5057428, A & DE, 68908835, E & JP, 2-109966, A	13, 14
A	JP, 6-38730, A (Sakai Enetsukusu K.K.), 15 February, 1994 (15.02.94) (Family: none)	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 November, 2000 (14.11.00)

Date of mailing of the international search report
28 November, 2000 (28.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. C1⁷ C12M3/00, C12N7/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. C1⁷ C12M1/00~3/00, C12N7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	日本機械学会熱工学講演会講演論文集, (1997)No. 97-25, p. 233-235 Kennichi YANAGI et al. "High-density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver"	15-17 13, 14, 18-20
X Y	EP, 402272, A (TERUMO CORP) 12日. 12月. 1990 (12. 12. 90) & DE, 69022778, E & JP, 3-15382, A	15-17 13, 14, 18-20
Y	EP, 365313, A (KIRIN BEER KK) 25日. 4月. 1990 (25. 04. 90) & CA, 2001113, A & US, 5057428, A & DE, 68908835, E & JP, 2-109966, A	13, 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
14. 11. 00

国際調査報告の発送日 29.11.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
鈴木 恵理子

印

4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference JA904421	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/05582	International filing date (<i>day month year</i>) 21 August 2000 (21.08.00)	Priority date (<i>day month year</i>) 20 August 1999 (20.08.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12M 3/00, C12N 7/00, 5/08		
Applicant NAGAMORI, Seishi		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 January 2001 (16.01.01)	Date of completion of this report 02 May 2001 (02.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-24, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1-4,6-14,16, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 5,15,18, filed with the letter of 13 April 2001 (13.04.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1-8, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-3, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☒ the claims, Nos. 17,19,20
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17)

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-16,18	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16,18	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16,18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**Claims 1-16 and 18**

None of document 1 ["High-density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver," Kennichi Yanagi et al., Proceedings of Thermal Engineering Conference of the Japan Society of Mechanical Engineers, 1997, No. 97-25, pages 233-235], document 2 [EP, 402272, A (Terumo Corp.), 12 December, 1990 (12.12.90), and document 3 [EP, 365313, A (Kirin Brewery Co., Ltd.), 25 April, 1990 (25.04.90)] respectively cited in the ISR describes a bioreactor containing a granular porous carrier loaded with hepatocytes, in which a liquid culture medium is made to flow from the peripheral region toward the central region, as a method of proliferating hepatocytes that is a technical feature of the subject matters of claims 1-16 and 18. On the other hand, the constitution employed in the subject matters of claims 1-16 and 18 gives an effect unpredictable from the descriptions of documents 1-3, that a hepatitis virus can be proliferated.

So, the subject matters of claims 1-16 and 18 appear to be novel and to involve an inventive step.

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[PCT 18 条、PCT 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 JA904421	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05582	国際出願日 (日.月.年) 21.08.00	優先日 (日.月.年) 20.08.99
出願人(氏名又は名称) 永森 静志		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18 条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT 規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12M3/00, C12N7/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12M1/00~3/00, C12N7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	日本機械学会熱工学講演会講演論文集, (1997)No. 97-25, p. 233-235	15-17
Y	Kennichi YANAGI et al. "High-density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver"	13, 14, 18-20
X	EP, 402272, A (TERUMO CORP) 12日. 12月. 1990	15-17
Y	(12. 12. 90) & DE, 69022778, E & JP, 3-15382, A	13, 14, 18-20
Y	EP, 365313, A (KIRIN BEER KK) 25日. 4月. 1990	13, 14
	(25. 04. 90) & CA, 2001113, A & US, 5057428, A & DE, 68908835, E & JP, 2-109966, A	

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 11. 00

国際調査報告の発送日

22.11.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4 N

8 1 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 6-38730, A (サカイエネックス株式会社) 15日. 2月. 1994 (15. 02. 94) (ファミリーなし)	1-20

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 18 MAY 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 JA904421	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/05582	国際出願日 (日.月.年) 21.08.00	優先日 (日.月.年) 20.08.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C12M3/00, C12N5/08, C12N7/00		
出願人(氏名又は名称) 永森 静志		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☒ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で 2 ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 16.01.01	国際予備審査報告を作成した日 02.05.01		
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 印	4N	8114
電話番号 03-3581-1101 内線 3488			

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-24 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1-4, 6-14, 16 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 5, 15, 18 項、 13.04.01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-8 図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 明細書の配列表の部分 第 1-3 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 17, 19, 20 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-16, 18

請求の範囲

有

無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-16, 18

請求の範囲

有

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-16, 18

請求の範囲

有

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-16, 18について

国際調査報告で引用した文献1~3(日本機械学会熱工学講演会講演論文集, (1997)No. 97-25, p. 233-235 Kennichi YANAGI et al. "High-density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver", EP, 4 022 72, A (TERUMO CORP) 12日. 12月. 1990(12. 12. 90)、EP, 3 653 13, A (KIRIN BEER KK) 25日. 4月. 1990(25. 04. 90))のいずれにも、請求の範囲1-16, 18の発明の技術的特徴である、肝細胞の増殖方法として、肝細胞を担持させた粒子状の多孔性担体を収容するバイオリクターにおいて、周縁部から中心部に向けて培養液を流通させた点について、記載も示唆もない。一方、請求の範囲1-16, 18の発明においては、上記構成を採用することにより、肝炎ウィスを増殖できるという上記文献1~3の記載から予測できない効果が奏せられたものである。

したがって、請求の範囲1-16, 18の発明には、新規性、進歩性がある。

請 求 の 範 囲

1. 接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させ、培養されている細胞に肝炎ウイルスを感染させて、当該肝炎ウイルスを増殖させることからなる肝炎ウイルスの増殖方法。
2. 担体が、粒子状の多孔性担体である請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 接着性の低い細胞か、肝細胞である請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 接着性の低い細胞が、樹立細胞である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の方法。
5. (補正後) 肝炎ウイルスが、C型肝炎ウイルス(HCV)である請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の方法。
6. 担体周縁の培養液の流れが、培養器の外周から中心部への流れである請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の方法。
7. 粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させることを含む、肝炎ウイルスの増殖方法。
8. 前記肝細胞は樹立細胞株である請求の範囲第7項記載の方法。
9. 前記樹立細胞株はFLC-4株(FERM BP-5165)である請求の範囲第8項記載の方法。
10. 肝炎ウイルスの感染は、前記培養液中に肝炎ウイルスを添加することにより行われ、肝炎ウイルスを培養液に添加後、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させ、次いで、培養液の流通を停止し、次いで、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させて培養する工程を含む請求の範囲第7項ないし第9項のいずれか1項に記載の方法。

- 1 1. 肝炎ウイルスを培養液に添加する前に、新鮮な培地の供給速度及び酸素供給速度をそれまでの速度よりも大きくする請求の範囲第 7 項ないし第 1 0 項のいずれか 1 項に記載の方法。
- 1 2. 前記肝炎ウイルスは C 型肝炎ウイルスである請求の範囲第 7 項ないし第 1 1 項のいずれか 1 項に記載の方法。
- 1 3. 周縁部から中心部に向けて培養液を流通させることができるバイオリアクター本体と、該バイオリアクター本体の周縁部に培養液を供給する培養液供給路と、該バイオリアクター本体の内部に收容され、その上に肝細胞が担持される粒子状の多孔性担体と、該バイオリアクター本体の内部に位置し、培養液をバイオリアクター本体から排出する培養液排出路とを具備したラジアルフロー型肝細胞バイオリアクターから成る肝炎ウイルスの増殖装置。
- 1 4. C 型肝炎ウイルスの増殖装置である請求の範囲第 1 3 項記載の増殖装置。
- 1 5. (補正後) 粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させ、これを收容するラジアルフロー型バイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて、粒子状の多孔性担体上に肝細胞を増殖させることからなる、肝細胞を増殖する方法。
- 1 6. 増殖が、3 次元的な増殖である請求の範囲第 1 5 項に記載の方法。
- 1 7. (削除)
- 1 8. (補正後) 肝細胞が、樹立細胞である請求の範囲第 1 5 項又は第 1 6 項に記載の方法。
- 1 9. (削除)
- 2 0. (削除)

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

P C T

国際出願番号及び 国際出願日の通知書

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP00/05582

RO105

発送日（日、月、年）

29.08.00

出願人又は代理人

の書類記号

JA904421

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP00/05582

国際出願日（日、月、年）

21.08.00

優先日（日、月、年）

20.08.99

出願人（氏名又は名称）

永森 静志

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、29日08月00年に国際事務局に送付した。

注 意

- a. 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- b. 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- c. あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- d. 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- e. この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- f. 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TFL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関3丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特許庁長官

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）

出願人代理人

佐伯 憲生

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所

P C T

調査用写しの受理通知書

（法施行規則第39条）
〔PCT規則25.1〕

PCT/JP00/05582

SA202

発送日（日、月、年）

29.08.00

出願人又は代理人

の書類記号

JA904421

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/05582

国際出願日（日、月、年）

21.08.00

優先日（日、月、年）

20.08.99

出願人（氏名又は名称）

永森 静志

1. 国際調査機関と受理官庁が同一の機関でない場合、

国際出願の調査用写しを国際調査機関が下記の日に受理したので通知する。

国際調査機関と受理官庁が同一の機関である場合、

国際出願の調査用写しを下記の日に受理したので通知する。

29 日 08 月 00 年（受理の日）

2. ☒ 調査用写しには、コンピューター読取りが可能な形式によるヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が添付されている。

3. 国際調査報告の作成期間

国際調査報告の作成期間は、上記受理の日から3箇月の期間又は優先日から9箇月の期間のいずれか遅く満了する期間である。

4. この通知書の写しは、国際事務局及び上記1の第1文が適用される場合には受理官庁に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/ISA/202（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

JA904421

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 15 September 2000 (15.09.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference JA904421	International application No. PCT/JP00/05582

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

NAGAMORI, Seishi (all designated States)

MIYAMURA, Tatsuo (for all designated States except US)

International filing date : 21 August 2000 (21.08.00)
Priority date(s) claimed : 20 August 1999 (20.08.99)
Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 04 September 2000 (04.09.00)
List of designated Offices :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : JP, KR, US

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

Susumu Kubo

Telephone No. (41-22) 338.83.38

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. **It is the applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 06 November 2000 (06.11.00)	
Applicant's or agent's file reference JA904421	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/05582	International filing date (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)
Applicant NAGAMORI, Seishi et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An **asterisk(*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
20 Augu 1999 (20.08.99)	11/233647	JP	05 Octo 2000 (05.10.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Khemais BRAHMI

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

JA 904421

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPONDate of mailing (day/month/year)
25 October 2000 (25.10.00)Applicant's or agent's file reference
JA904421

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/JP00/05582International filing date (day/month/year)
21 August 2000 (21.08.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

NAGAMORI, Seishi
Jikei University School of Medicine
3-25-8, Nishi-shinbashi
Minato-ku, Tokyo 105-0003
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

NAGAMORI, Seishi
3-42-3, Shiba
Minato-ku
Tokyo 105-0014
Japan

State of Nationality

JP

State of Residence

JP

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Sean Taylor

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

S

JA904421

Date of mailing (day/month/year) 01 March 2001 (01.03.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference JA904421			
International application No. PCT/JP00/05582	International filing date (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)	Priority date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)	
Applicant NAGAMORI, Seishi et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

EP,JP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 01 March 2001 (01.03.01) under No. WO 01/14517

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0027
JAPON

S

JA904421

Date of mailing (day/month/year) 01 March 2001 (01.03.01)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference JA904421			
International application No. PCT/JP00/05582	International filing date (day/month/year) 21 August 2000 (21.08.00)	Priority date (day/month/year) 20 August 1999 (20.08.99)	
Applicant NAGAMORI, Seishi et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : JP, KR, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

None

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed **until 31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer: J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	---

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。

様式PCT/1PEA/401 (第1用紙) (1998年7月)

第III欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

電話番号:

03-5205-2521

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

ファクシミリ番号:

03-5205-2522

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome,

加入電話番号:

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第IV欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述: *

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正 (添付した説明書も含む) を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後まで延期されることを望む (ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く (規則 69.1(d)))。
(この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合にのみ、レ印を付すことができます。)

* 記入がない場合は、1) 補正がないか又は国際予備審査機関が補正 (原本又は写し) を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査を開始され、2) 国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正 (原本又は写し) を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は、日本語 であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第V欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国 (即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第II章に拘束されている国) を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。:

第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予備審査機関記入欄

1. 国際出願の翻訳文・・・・・・・・・・・・・・・・・・
2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書・・・・・・・・
3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し・・・・・・・・
4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し・・・・・・・・
5. 書簡・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
6. その他 (書類名を具体的に記載する) :

枚
枚
枚
枚
枚
枚

受 領

未 受 領

☐
☐
☐
☐
☐
☐
☐
☐
☐
☐
☐
☐

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙
2. ☐ 別個の記名押印された委任状
3. ☐ 包括委任状の写し
4. ☐ 記名押印 (署名) に関する説明書
5. ☐ スクレスチッド又はアミノ酸配列表
6. ☐ その他 (書類名を具体的に記載する) :

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

佐 伯 憲 生



国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。☐ 出願人に通知した。4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:

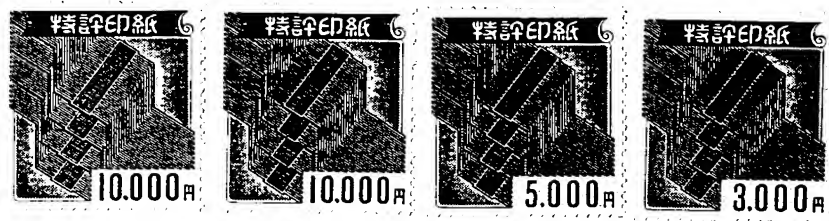
第 II 章

P C T

手 数 料 計 算 用 紙

国 際 予 備 審 査 請 求 書 の 附 属 書

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 5px;"> 国際出願番号 <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">P C T / J P 0 0 / 0 5 5 8 2</div> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> 出願人又は代理人の書類記号 <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">J A 9 0 4 4 2 1</div> </div>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; height: 100px;"> <div style="text-align: center; font-weight: bold;">国際予備審査機関記入欄</div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">国際予備審査機関の日付印</div> </div>
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> 出願人 <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">永 森 静 志</div> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 10px;"> <div style="text-align: center; font-weight: bold; margin-bottom: 10px;">所定の手数料の計算</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="width: 40%;"> 1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法） 第18条第1項第4号の規定による手数料 （予備審査請求料）（注1） </div> <div style="width: 55%; text-align: right;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 2 8 , 0 0 0 円 P </div> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="width: 40%;"> 2. 取扱手数料（注2）・・・・・・・・・・・・・・・・ </div> <div style="width: 55%; text-align: right;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 1 4 , 6 0 0 円 H </div> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="width: 40%;"> 3. 所定の手数料の合計 P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入・・ </div> <div style="width: 55%; text-align: right;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 5px;"> 4 2 , 6 0 0 円 </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-top: 5px;"> 合 計 </div> </div> </div> <div style="margin-top: 20px;"> <p>（注1）法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。</p> <p>（注2）取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。</p> </div> </div>	




予備審査請求手数料

28,000円

ご利用明細

ご来店いただき
ありがとうございます。

 東京三菱銀行

年月日	取扱店番	お取引内容	
130115	0022102	お振込	
受付通番	銀行番号	支店番号	口座番号
7914	0022	0632671	
時刻	税込手数料	お取引金額	
14.32	¥105★	¥14,600★	
お取扱いき ない場合		残 高	
お取扱金額 *****			
ご案内 かつ *****			
お振込先は 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA様 ご依頼人は タクミトツキヨシムシヨ サエキ ノリ オ様 電 話 0352052521			



取扱手数料

14,600円

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

佐伯 憲生

あて名

〒103-0027

東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛
ビル9階 たくみ特許事務所

PCT/JP00/05582

PE402

P C T

国際予備審査請求書の の受理通知書

（法施行規則第54条第1項）

〔PCT規則59.3(e)及び61.1(b)第1文、
実施細則601(a)〕

発送日（日・月・年）

23.01.01

出願人又は代理人

の書類記号

JA904421

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/05582

国際出願日（日・月・年）

21.08.00

優先日（日・月・年）

20.08.99

出願人（氏名又は名称）

永森 静志

1. 国際予備審査機関は、国際出願の国際予備審査請求書を次の日に受理したことを通知する。

16日01月01年

2. この受理の日は次に示す日である。

- ☒ 管轄する国際予備審査機関が国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則61.1(b)）
- ☐ 管轄する国際予備審査機関に代わって国際予備審査請求書を受理した日
（PCT規則59.3(e)）
- ☐ 国際予備審査請求書の手続き補完書を管轄する国際予備審査機関が受理した日

3. ☐ 受理の日は、優先日から19箇月が経過している。

（注意） 国際予備審査請求書に記載した選択国の国内段階開始時期の優先日から30箇月まで（遅い官庁がある）の効果はない。（PCT第39条（1））したがって、国内段階移行の手続きは、優先日から20箇月以内（遅い官庁がある）に行わなければならない。（PCT第22条）
詳細については、PCT出願人の手引き・第II巻」を参照すること。

☐ この内容は、口頭又は電話により次の日に行った連絡を確認するためのものである。

4. 上記の3に該当する場合に、この通知書の写しは国際事務局に送付した。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号 100-8915 TEL03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関3丁目4番3号

様式PCT/IPEA/102（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号
高愛ビル 9階

PCT見解書

JA904421

(法第13条)
〔PCT規則66〕

発送日
(日.月.年)

130201

出願人又は代理人
の書類記号

JA904421

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/05582

国際出願日

(日.月.年) 21.08.00

優先日

(日.月.年) 20.08.99

国際特許分類 (IPC) Int. Cl⁷ C12M3/00、C12N7/00

出願人 (氏名又は名称)

永森 静志

- これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。
- この見解書は、次の内容を含む。
 - ☒ 見解の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見
- 出願人は、この見解書に応答することが求められる。
いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。
どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。
なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。
応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。
- 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 20.12.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
鈴木 恵理子

4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づき命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条(PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-14, 18-20	有
	請求の範囲	15, 16, 17	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-20	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-20	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

請求の範囲15-17について

国際調査報告で引用した文献1(日本機械学会熱工学講演会講演論文集, No. 9 7-25, p. 233-235(1997) Kennichi YANAGI et al.) には、肝細胞を付着させた粒子状の多孔性単体を充填した充填層型リアクターに、培養液を灌流させ酸素供給量を調整することによる、肝細胞の高密度培養法が記載されており、請求の範囲15-17の発明は上記文献1に記載されている。

請求の範囲1-12、18-20について

請求の範囲1の発明と上記文献1の発明は、前者が、培養されている細胞に更に肝炎ウイルスを感染させ、該肝炎ウイルスを増殖させる方法であるのに対して、後者が肝細胞の増殖法である点で、相違する。しかしながら、肝細胞等の動物細胞を増殖培養する目的として、同文献2(EP, 402272, A (TERUMO CORP) 12. 12月. 1990(12. 12, 90))の第3頁左上欄下から2~1行にも記載のように、ワクチンの生産に用いることは自明のことであり、上記文献1の肝細胞の増殖法により増殖された肝細胞に、更に肝炎ウイルスを感染させて増殖させることは、当業者が容易になし得たことである。

また、請求の範囲1の発明を技術的に具体化、限定化した請求の範囲2-12の発明及び請求の範囲15の発明を具体化した請求の範囲18-20の発明のいずれにおいても、格別の特徴となる構成は見いだせず、請求の範囲2-12及び18-120の発明も、上記文献1の記載から当業者が容易になし得たものである。

請求の範囲13、14

ラジアルフロー型バイオリアクターは、本願優先日前既に広く知られた周知のものであり、請求の範囲1の肝炎ウイルスの増殖法に用いる装置として、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いることにも、格別な特徴は見いだせない。

	下	編	補	正	書
特許庁長官 (特許庁事務官)					版 版)
1	国際出願の表示				
2	出願人 (代表者) 氏名 (名称) あて名 国籍 住所				
3	代理人 氏名 あて名				
4	補正命令の日付				
5	補正の対象				
6	補正の内容				
7	添付書類の日付				

配列表

SEQUENCE LISTING

· 110 · Seishi NAGAMORI

· 120 · Method for Proliferating Hepatitis Virus and Apparatus Therefor

· 130 · JA904421

· 150 · JP 11-233647

· 151 · 1999-08-20

· 160 · 5

· 210 · 1

· 211 · 20

· 212 · DNA

· 213 · Artificial Sequence

· 223 · primer used for synthesizing cDNA of hepatitis C virus by reverse transcription

· 400 · 1

aacactactc ggctagcagt 20

· 210 · 2

· 211 · 20

· 212 · DNA

· 213 · Artificial Sequence

· 223 · primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

· 400 · 2

ctgtgaggaa ctactgtctt 20

· 210 · 3

· 211 · 20

· 212 · DNA

· 213 · Artificial Sequence

· 223 · primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

· 400 · 3

aacaetactc ggctagcagt 20

· 210 · 4

· 211 · 20

· 212 · DNA

· 213 · Artificial Sequence

· 223 · primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

· 400 · 4

ttcacgcaga aagcgtctag 20

· 210 · 5

· 211 · 20

· 212 · DNA

· 213 · Artificial Sequence

· 223 · primer used for amplifying by PCR hepatitis C virus cDNA

· 400 · 5

gttgatccaa gaaaggaccc

20

手 続 補 正 書

(法第11条の規定による補正)



特許庁審査官 鈴木 恵理子 殿

1. 国際出願の表示 PCT/JPO0/05582

2. 出願人

氏 名 永 森 静 志

NAGAMORI Seishi

あて名 〒105-0014

日本国東京都港区芝3-42-3

3-42-3, Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014 JAPAN

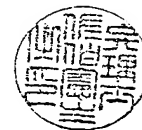
国 籍 日本国 JAPAN

住 所 日本国 JAPAN

3. 代理人

氏 名 (10266) 弁理士 佐 伯 憲 生

SAEKI Norio



あて名 〒103-0027

日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2,

Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 補正の対象 請求の範囲

5. 補正の内容

請求の範囲第25頁第5項の「HCV」を「C型肝炎ウイルス(HCV)」に補正し、同「請求の範囲第5項」を「請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項」に補正する。

請求の範囲第26頁第15項の

「 接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させること

からなる、接着性の低い細胞を増殖する方法。」を、
「粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させ、これを収容するラジアルフロー型バイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて、粒子状の多孔性担体上に肝細胞を増殖させることからなる、肝細胞を増殖する方法。」

に補正し、請求の範囲第26頁第18項の「接着性の低い細胞が、」を、「肝細胞が、」に補正し、請求の範囲第26頁第17項、第19～20項を削除する。

6. 添付書類の目録

請求の範囲第25頁～第26頁

請 求 の 範 囲

1. 接着性の低い細胞を担持させ得る担体を収容した培養器の担体周縁に培養液の流れを作り、接着性の低い細胞を当該担体に担持させて増殖させ、培養されている細胞に肝炎ウイルスを感染させて、当該肝炎ウイルスを増殖させることからなる肝炎ウイルスの増殖方法。
2. 担体が、粒子状の多孔性担体である請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 接着性の低い細胞が、肝細胞である請求の範囲第1項又は第2項に記載の方法。
4. 接着性の低い細胞が、樹立細胞である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれかに記載の方法。
5. (補正後)肝炎ウイルスが、C型肝炎ウイルス(HCV)である請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の方法。
6. 担体周縁の培養液の流れが、培養器の外周から中心部への流れである請求の範囲第1項ないし第5項のいずれか1項に記載の方法。
7. 粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させたものを収容するバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させるラジアルフロー型肝細胞バイオリアクター中に維持された前記肝細胞に肝炎ウイルスを感染させ、引き続きバイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて前記肝細胞を培養し、それによって前記感染された肝炎ウイルスを前記肝細胞中で増殖させることを含む、肝炎ウイルスの増殖方法。
8. 前記肝細胞は樹立細胞株である請求の範囲第7項記載の方法。
9. 前記樹立細胞株はFLC-4株(FERM BP-5165)である請求の範囲第8項記載の方法。
10. 肝炎ウイルスの感染は、前記培養液中に肝炎ウイルスを添加することにより行われ、肝炎ウイルスを培養液に添加後、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させ、次いで、培養液の流通を停止し、次いで、新鮮な培地を供給せずに、使用した培地を循環させて培養する工程を含む請求の範囲第7項ないし第9項のいずれか1項に記載の方法。

- 1 1. 肝炎ウイルスを培養液に添加する前に、新鮮な培地の供給速度及び酸素供給速度をそれまでの速度よりも大きくする請求の範囲第 7 項ないし第 10 項のいずれか 1 項に記載の方法。
- 1 2. 前記肝炎ウイルスは C 型肝炎ウイルスである請求の範囲第 7 項ないし第 11 項のいずれか 1 項に記載の方法。
- 1 3. 周縁部から中心部に向けて培養液を流通させることができるバイオリアクター本体と、該バイオリアクター本体の周縁部に培養液を供給する培養液供給路と、該バイオリアクター本体の内部に收容され、その上に肝細胞が担持される粒子状の多孔性担体と、該バイオリアクター本体の内部に位置し、培養液をバイオリアクター本体から排出する培養液排出路とを具備したラジアルフロー型肝細胞バイオリアクターから成る肝炎ウイルスの増殖装置。
- 1 4. C 型肝炎ウイルスの増殖装置である請求の範囲第 13 項記載の増殖装置。
- 1 5. (補正後) 粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させ、これを收容するラジアルフロー型バイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて、粒子状の多孔性担体上に肝細胞を増殖させることからなる、肝細胞を増殖する方法。
- 1 6. 増殖が、3 次元的な増殖である請求の範囲第 15 項に記載の方法。
- 1 7. (削除)
- 1 8. (補正後) 肝細胞が、樹立細胞である請求の範囲第 15 項又は第 16 項に記載の方法。
- 1 9. (削除)
- 2 0. (削除)

Written Amendment

(Amendment under the Provision of Article 11 in JAPAN)

To: Ms. Eriko Suzuki, the Examiner of the JPO

1. Indication of International Application: PCT/JP00/05582

2. Applicant:

Name	Seishi Nagamori
Address	3-42-3, Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014 JAPAN
Nationality	JAPAN
Address	JAPAN

3. Representative:

Name	Norio Sacki, Patent Attorney (Reg. No. 10266)
Address	9th Floor, Taka-ai Building, 15-2 Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. Object to be Amended:

Claims

5. Content of the Amendment:

In claim 5 of page 25, "HCV" is amended to read "hepatitis type C virus (HCV)", and "claim 5" is amended to read "any one of claims 1 to 4".

In claim 15 of page 26, "A method for proliferating a cell with low adhesivity, characterized by making a liquid culture medium flow around the periphery of a carrier

capable of immobilizing thereon the cell with low adhesivity in a culture vessel placing therein the carrier, and immobilizing and proliferating the cell with low adhesivity on the carrier.” is amended to read “A method for proliferating hepatocyte, characterized by immobilizing hepatocyte on a particulate porous carrier and allowing a liquid culture medium to flow from the periphery of a radial flow type main bioreactor unit placing therein the particulate porous carrier toward the center thereof, to proliferate the hepatocyte on the particulate porous carrier.”.

In claim 18 of page 26, “the cell with low adhesivity” is amended to read “the hepatocyte”.

Claims 17, 19 and 20 of page 26 are canceled.

6. List of the Document Attached:

Page 25 to 26 (Claims, Japanese Specification)

CLAIMS (Amended)

1. A method for proliferating a hepatitis virus, characterized by
making a liquid culture medium flow around the periphery of a carrier being placed in a culture vessel and capable of immobilizing a cell with low adhesivity thereon,
immobilizing and proliferating the cell with low adhesivity on the carrier, and
allowing the cell under culture to be infected with a hepatitis virus to proliferate the hepatitis virus.
2. A method according to claim 1, where the carrier is a particulate porous carrier.
3. A method according to claim 1 or 2, where the cell with low adhesivity is hepatocyte.
4. A method according to any one of claims 1 to 3, where the cell with low adhesivity is an established cell.
5. (Amended) A method according to any one of claims 1 to 4, where the hepatitis virus is hepatitis type C virus (HCV).
6. A method according to any one of claims 1 to 5, where the flow of the liquid culture medium around the periphery of the carrier is a flow from the outer periphery of the culture vessel toward the center thereof.
7. A method for proliferating a hepatitis virus, characterized by
allowing hepatocyte maintained in a radial flow type hepatocyte bioreactor to permit a liquid culture medium to flow from the periphery of the main bioreactor unit placing therein a particulate porous carrier immobilizing thereon the hepatocyte toward the center thereof, to be infected with a hepatitis virus, and
continuously allowing the liquid culture medium to flow from the periphery of

the main bioreactor unit toward the center thereof to culture the hepatocyte to thereby proliferate the infectious hepatitis virus in the hepatocyte.

8. A method according to claim 7, where the hepatocyte is of an established cell line.

9. A method according to claim 8, where the established cell line is the FLC-4 line (FERM BP-5165).

10. A method according to any one of claims 7 to 9, where the infection with the hepatitis virus is carried out by adding the hepatitis virus to the liquid culture medium, the method being characterized by

a step of adding the hepatitis virus to the liquid culture medium and subsequently circulating the culture medium used under no supply of any fresh one of the culture medium, and

a step of subsequently stopping the flow of the liquid culture medium and circulating the culture medium used under no supply of fresh one of the culture medium.

11. A method according to any one of claims 7 to 10, characterized in that the supply velocity of fresh one of the culture medium and the supply velocity of oxygen are increased more than those velocities till then, prior to the addition of the hepatitis virus to the liquid culture medium.

12. A method according to any one of claims 7 to 11, where the hepatitis virus is hepatitis type C virus.

13. A proliferation apparatus of a hepatitis virus, characterized in that the apparatus is a radial flow type hepatocyte bioreactor having

a main bioreactor unit capable of allowing a liquid culture medium to flow from the periphery to the center thereof.

a liquid culture medium supply conduit supplying the liquid culture medium to the periphery of the main bioreactor unit,

a particulate porous carrier placed in the inside of the main bioreactor unit to immobilize hepatocyte thereon, and

a liquid culture medium discharge conduit positioned in the inside of the main bioreactor unit for discharging the liquid culture medium from the main bioreactor unit.

14. A proliferation apparatus according to claim 13, which is a proliferation apparatus of hepatitis type C virus.

15. (Amended) A method for proliferating hepatocyte, characterized by

immobilizing hepatocyte on a particulate porous carrier and allowing a liquid culture medium to flow from the periphery of a radial flow type main bioreactor unit placing therein the particulate porous carrier toward the center thereof, to proliferate the hepatocyte on the particulate porous carrier.

16. A method according to claim 15, where the proliferation is three-dimensional proliferation.

17. (Canceled)

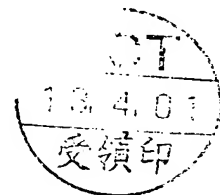
18. (Amended) A method according to claim 15 or 16, where the hepatocyte is an established cell.

19. (Canceled)

20. (Canceled)

Reply to Written Opinion

答 弁 書



特許庁審査官 鈴木 恵理子 殿

1. 国際出願の表示 PCT/JPO0/05582

2. 出願人

氏 名 永 森 静 志

NAGAMORI Seishi

あて名 〒105-0014

日本国東京都港区芝3-42-3

3-42-3, Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014 JAPAN

国 籍 日本国 JAPAN

住 所 日本国 JAPAN

3. 代理人

氏 名 (10266) 弁理士 佐 伯 憲 生

SAEKI Norio



あて名 〒103-0027

日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2,

Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 通知の日付 13.02.01

5. 答弁の内容

(1) 補正について

今回、本件の請求の範囲第15～20項を同時に提出いたしました手続補正書にて補正いたしました。また、補正前の請求の範囲第5項には記載上の不備がありましたのでこれを修正いたしました。

補正後の請求の範囲第5項及び第15～20項は、次の通りであります。

「5. (補正後) 肝炎ウイルスが、C型肝炎ウイルス(HCV)である請求の範囲第1項ないし第4項のいずれか1項に記載の方法。」

「15. (補正後) 粒子状の多孔性担体上に肝細胞を担持させ、これを収容するラジアルフロー型バイオリアクター本体の周縁部から中心部に向けて培養液を流通させて、粒子状の多孔性担体上に肝細胞を増殖させることからなる、肝細胞を増殖する方法。

16. 増殖が、3次元的な増殖である請求の範囲第15項に記載の方法。

17. (削除)

18. (補正後) 肝細胞が、樹立細胞である請求の範囲第15項又は第16項に記載の方法。

19. (削除)

20. (削除)」

(2) 引用文献一覧

文献1 (日本機械学会熱工学講演会講演論文集, NO.97-25, p.233-235 (1997) Kennichi YANAGI et al.)

文献2 (EP, 402272, A (TERUMO CORP) 12. 12月. 1990 (12. 12. 90))

(3) 見解書の概要

請求の範囲15-17について

国際調査報告で引用した文献1 (日本機械学会熱工学講演会講演論文集, NO.97-25, p.233-235 (1997) Kennichi YANAGI et al.) には、肝細胞を付着させた粒子状の多孔性単体を充填した充填層型リアクターに、培養液を灌流させ酸素供給量を調整することによる、肝細胞の高密度培養法が記載されており、請求の範

図 1 5 - 1 7 の発明は上記文献 1 に記載されている。

請求の範囲 1 - 1 2、1 8 - 2 0 について

請求の範囲 1 の発明と上記文献 1 の発明は、前者が、培養されている細胞に更に肝炎ウイルスを感染させ、該肝炎ウイルスを増殖させる方法であるのに対して、後者が肝細胞の増殖法である点で、相違する。しかしながら、肝細胞等の動物細胞を増殖培養する目的として、同文献 2 (E P, 4 0 2 2 7 2, A (TERUMO CORP) 1 2, 1 2 月, 1 9 9 0 (1 2, 1 2, 9 0)) の第 3 頁左上欄下から 2 ~ 1 行にも記載のように、ワクチンの生産に用いることは自明のことであり、上記文献 1 の肝細胞の増殖法により増殖された肝細胞に、更に肝炎ウイルスを感染させて増殖させることは、当業者が容易になし得たことである。

また、請求の範囲 1 の発明を技術的に具体化、限定化した請求の範囲 2 - 1 2 の発明及び請求の範囲 1 5 の発明を具体化した請求の範囲 1 8 - 2 0 の発明のいずれにおいても、格別の特徴となる構成は見いだせず、請求の範囲 2 - 1 2 及び 1 8 - 1 2 0 の発明も、上記文献 1 の記載から当業者が容易になし得たものである。

請求の範囲 1 3、1 4

ラジアルフロー型バイオリアクターは、本願優先日前既に広く知られた周知のものであり、請求の範囲 1 の肝炎ウイルスの増殖法に用いる装置として、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いることにも、格別な特徴は見いだせない。

(4) 文献 1 及び 2 に記載されている事項と本件発明との対比

本件発明は、H C V (C 型肝炎ウイルス) に関しては、遺伝子レベルの研究が先行し、未だにウイルスの複製、粒子形成、変異等の生物学及び発癌機構の解明などの基礎的な研究は進んでおらず、H C V のワクチン、プロテアーゼ阻害剤、アンチセンス等の薬剤による治療法の開発も進展していないという現状、そしてその原因が、H C V を培養肝細胞中で増殖させることは非常に困難なことであり、

未だかつてこれに成功したという報告はない（肝炎ウイルスの増殖成功の報告、特に大量のHCVの増殖の報告は未だ皆無である。）ということ、つまり生体外におけるHCVの増殖系が未だに存在しないことに起因するという点に鑑みなされたものであります。

この点につきまして、本件の優先権の主張の基礎出願の出願日当時の文献を参考資料1（サイエンス、第285巻、第26-30頁、1999年6月2日発行）として提出いたします。参考文献1は、C型肝炎に関する文献でありまして、そこには、

「 培養株の障害

しかしながら、C型肝炎の研究において、この分野で最も必要とされるものは何かと問われたとき、それはお金の問題ではない。カリフォルニア州のラジョラのスクリプス研究所の肝炎の免疫学者の権威であるフランク・チサリーが、『我々には、培養系が絶対に必要である。』と言っているとおりであります。今日までに、実験室レベルでの細胞の培養においてHCV（C型肝炎ウイルス）を信頼できる状態で増殖させ得た者は誰もいない。この培養系の欠如が、ワクチンの開発は勿論のこと、ウイルスのライフサイクルのような基礎的な研究も決定的に遅らせているのである。」

（参考資料1、第29頁左欄下から13行目～2行目）

と記載されていますように、本件の基礎出願のなされた当時肝細胞の培養系は文献1にもありますように知られていたとしても、肝炎ウイルスの培養系は知られていなかったのであります。これは、培養系における肝細胞の状況が生体内での肝細胞の状況が異なるために、生体内では増殖できる肝炎ウイルスも培養系の肝細胞では増殖することはできなかったのであります。

したがって、肝細胞を培養できる系が知られていたとしても、その系により肝炎ウイルスを増殖できるかどうかを予測できないことは勿論のこと、どのような培養系により肝炎ウイルスを増殖することができるかということ予測することはできなかったのであります。

文献1は、ハイブリッド型人工肝臓の開発を目的とする肝細胞の高密度培養法、特に、その培養条件の検討に関するもので、本文献中には、審査官殿ご指摘の通

り、「肝細胞を付着させた粒子状の多孔性担体を充填した充填層型リアクターに、培養液を灌流させ酸素供給量を調整することによる、肝細胞の高密度培養法」は記載されておりますが、肝炎ウイルスを増殖させることができることについては記載も示唆もされておられません。文献１に記載の培養系は本発明の方法と似ている「高密度培養法」が記載され、単層培養との比較も記載されております。しかし、文献１には本発明のラジアルフロー型肝細胞バイオリアクターを用いる方法は開示されておられません。本発明の方法により初めて肝炎ウイルスを増殖できた原因についての詳細は必ずしも明らかではないのですが、文献１に記載の培養法では、アンモニア濃度の推移が減少する傾向を示す（文献１、第２３４頁の図１参照）のに対して、本発明の培養系では上昇し一定値となる傾向を示し、尿素濃度もほぼ同様の傾向を示す（参考資料２、第９８頁の図８参照）ことから、本発明の培養系と文献１に記載の培養系とは基本的に異なる培養系であることがわかります。参考資料２（永森、日本内科学会雑誌、第９０巻、第１号、第９１－１０３頁、２００１年）は、本件の発明者が本発明の培養系について解説した文献であり、本発明の培養系では生体内の状況に近い形で球形で肝細胞が培養されていることも参考資料２の第９５頁の図３に記載されております。

したがって、審査官の「文献１の肝細胞の増殖法により増殖された肝細胞に、更に肝炎ウイルスを感染させて増殖させることは、当業者が容易になし得たことである。」との認定は誤りであり、肝細胞の増殖法が知られていても、それにより肝炎ウイルスを増殖させることはできないのが本件の出願当時の状況であり、本発明が肝炎ウイルスを増殖させる問題を初めて解決したものであります。

なお、本発明の増殖方法の実施例で使用しているヒト肝由来培養細胞株ＦＬＣ－４は１９９８年に米国での特許も取得し（ＵＳＰ５８０４４４１）、蛋白産生能、薬物代謝能に関してこれまで国際的に最も機能を有するとされていたＨｅｐＧ２細胞よりも優れている。従って、本発明のより好ましい態様は当該細胞株ＦＬＣ－４を使用することである。

また、文献２は、細胞培養用基剤、同ユニット、バイオリアクター及び体外循環式治療器に関するもので、本文献の第３頁左上欄下から４～１行には、審査官殿ご指摘の通り、「動物細胞の培養技術は、インターフェロン、リンゴ酸カイン、

各種の成長ホルモンや細胞増殖因子等の生理活性物質や生体由来材料あるいは治療用ワクチン等の生産手段として不可欠のものである」旨の記載がありますが、肝炎ウイルスの増殖については全く記載も示唆もされておられません。

従いまして、このような文献 2 の記載と、人工肝臓の開発を目的としてラットの肝細胞を培養している上記文献 1 の記載とを組み合わせても、肝炎ウイルスの生体外での培養、増殖を初めて可能にした本願発明の構成は、容易に想到しうるものでは決してなく、本発明は新規性及び進歩性を有するものであると本件出願人は確信いたします。

請求の範囲第 13 及び 14 項に記載の発明は、装置に関するものであり、ラジアルフロー型バイオリアクターが本願優先日前既に広く知られたものであったとしても、これを肝炎ウイルスの増殖装置として使用できることは本発明により初めてなされたものであり、肝炎ウイルスの増殖装置として新規性及び進歩性を有するものであります。

請求の範囲第 15 ～ 20 項は、細胞の培養方法についての発明でありましたが、今回ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた肝細胞の増殖方法に特定しました。これにより本発明の増殖方法と文献 1 に記載の増殖方法との相違も明らかであり、かつ本発明の増殖方法は肝炎ウイルスを増殖させることができることから明らかなように、生体内の肝臓の状況に極めて近いものを提供することができたという顕著な効果を奏するものであり進歩性を有するものであります。

したがって、請求の範囲第 13 ～ 20 に記載の発明もまた新規性及び進歩性を有するものであります。

以上のとおりでありますから、本件の補正後の請求の範囲に記載の発明はいずれも新規性、進歩性及び産業上の利用可能性を有するものであります。

6. 添付書類の目録

(1) 参考資料 1	1 通
(2) 参考資料 2	1 通

あて名変更届

特許庁長官 殿

1. 国際出願の表示 PCT/JPO0/05582

2. 出 願 人

氏 名 永森 静志 NAGAMORI Seishi
あて名 〒105-0003 日本国東京都港区西新橋三丁目25番8号
東京慈恵会医科大学内
c/o Jikei University School of Medicine
3-25-8, Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo
105-0003 JAPAN

国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

3. あて名を変更した者

事件との関係 出願人及び発明者
氏 名 永森 静志 NAGAMORI Seishi
旧あて名 〒105-0003 日本国東京都港区西新橋三丁目25番8号
東京慈恵会医科大学内
c/o Jikei University School of Medicine
3-25-8, Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo
105-0003 JAPAN

新あて名 〒105-0014 日本国東京都港区芝3-42-3
3-42-3, Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014 JAPAN

国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

4. 代 理 人

氏 名 (10266) 弁理士 佐伯 憲生
SAEKI Norio

あて名 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目
15番2号 高愛ビル 9階
9th floor, Taka-ai Building, 15-2,
Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN



Notification of Change of Person

名 義 変 更 届



特許庁長官 殿

1. 国際出願の表示 P C T / J P 0 0 / 0 5 5 8 2
2. 出 願 人
名 称 科学技術振興事業団
Japan Science and Technology Corporation
あて名 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号
1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama
332-0012 JAPAN
国 籍 日本国 J a p a n
住 所 日本国 J a p a n
3. 届出の内容
事件との関係 新名義人
米国を除くすべての指定国における出願人
名 称 科学技術振興事業団
Japan Science and Technology Corporation
あて名 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号
1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama
332-0012 JAPAN
国 籍 日本国 J a p a n
住 所 日本国 J a p a n
- 事件との関係 指定国米国における出願人及びすべての指定国における
発明者
氏 名 永森 静志 N A G A M O R I S e i s h i
あて名 〒105-0014 日本国東京都港区芝3-42-3
3-42-3, Shiba, Minato-ku, Tokyo 105-0014 JAPAN
国 籍 日本国 J a p a n
住 所 日本国 J a p a n
4. 代 理 人
氏 名 (1 0 2 6 6) 弁理士 佐伯 憲生
S A E K I N o r i o
あて名 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目
15番2号 高愛ビル 9階
9th floor, Taka-ai Building, 15-2,
Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN
5. 添付書類の目録 代理権を証明する書面 1 通



委任状

2000年 12月 20日

私儀

弁理士 (10266) 佐伯 憲生 氏

を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願 PCT/JP00/05582

「肝炎ウイルスの増殖方法及び装置」

に関する一切の件

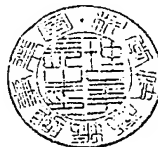
2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件



3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び
選択国の選択を取り下げる件

あて名 埼玉県川口市本町四丁目1番8号

名 称 科学技術振興事業団
理事長 川崎 雅弘



International Search Report

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)

出願人代理人

佐伯 憲生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号
高愛ビル 9階

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

(法施行規則第41条)
(PCT規則44.1)

発送日
(日.月.年)

28.11.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA904421

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JPO0/05582

国際出願日
(日.月.年)

21.08.00

出願人 (氏名又は名称)

永森 静志

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes

1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22)740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/JPO)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。

3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続において請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した、/する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/IPEA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 J A 9 0 4 4 2 1	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 5 5 8 2	国際出願日 (日.月.年) 2 1 . 0 8 . 0 0	優先日 (日.月.年) 2 0 . 0 8 . 9 9
出願人 (氏名又は名称) 永森 静志		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☒ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 1 図とする。 ☒ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. C1⁷ C12M3/00, C12N7/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. C1⁷ C12M1/00~3/00, C12N7/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	日本機械学会熱工学講演会講演論文集, (1997)No. 97-25, p. 233-235	15-17
Y	Kennichi YANAGI et al. "High-density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver"	13, 14, 18-20
X	EP, 402272, A (TERUMO CORP) 12日. 12月. 1990	15-17
Y	(12. 12. 90) & DE, 69022778, E & JP, 3-15382, A	13, 14, 18-20
Y	EP, 365313, A (KIRIN BEER KK) 25日. 4月. 1990 (25. 04. 90) & CA, 2001113, A & US, 5057428, A & DE, 68908835, E & JP, 2-109966, A	13, 14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
14. 11. 00

国際調査報告の発送日
20.11.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
鈴木 恵理子 印
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 6-38730, A (サカイエネックス株式会社) 15日. 2月. 1994 (15. 02. 94) (ファミリーなし)	1-20

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人 佐伯 憲生	殿
あて名 〒 103-0027 東京都中央区日本橋3丁目15番2号 高愛ビル9階 たくみ特許事務所	

S
JA904421

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
[PCT規則71.1]

発送日 (日.月.年)	15.05.01
----------------	----------

出願人又は代理人 の書類記号	JA904421	重要な通知
-------------------	----------	-------

国際出願番号 PCT/JPO0/05582	国際出願日 (日.月.年) 21.08.00	優先日 (日.月.年) 20.08.99
--------------------------	---------------------------	-------------------------

出願人（氏名又は名称） 永森 静志

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名 日本国特許庁（IPEA/JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 特 許 庁 長 官 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 8114
---	---	---------

注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒135-0016 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ビル

財団法人 日本特許情報機構 情報処理部業務課

TEL 03-3508-2313

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 JA904421	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05582	国際出願日 (日.月.年) 21.08.00	優先日 (日.月.年) 20.08.99
国際特許分類(IPC) Int. C1 ⁷ C12M3/00, C12N5/08, C12N7/00		
出願人(氏名又は名称) 永森 静志		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。 <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で 2 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 16.01.01	国際予備審査報告を作成した日 02.05.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 8114

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-24 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 1-4, 6-14, 16 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 5, 15, 18 項、 13, 04, 01 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-8 図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 明細書の配列表の部分 第 1-3 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☒ 請求の範囲 第 17, 19, 20 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-16, 18	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1-16, 18	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-16, 18	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1-16, 18について

国際調査報告で引用した文献1~3 (日本機械学会熱工学講演会講演論文集, (1997)No. 97-25, p. 233-235 Kennichi YANAGI et al. "High-density culture of hepatocytes for use as a bioartificial liver", EP, 4 022 72, A (TERUMO CORP) 12日. 12月. 1990 (12. 12. 90), EP, 3 653 13, A (KIRIN BEER KK) 25日. 4月. 1990 (25. 04. 90)) のいずれにも、請求の範囲1-16, 18の発明の技術的特徴である、肝細胞の増殖方法として、肝細胞を担持させた粒子状の多孔性担体を収容するバイオリアクターにおいて、周縁部から中心部に向けて培養液を流通させた点について、記載も示唆もない。一方、請求の範囲1-16, 18の発明においては、上記構成を採用することにより、肝炎ウイルスを増殖できるという上記文献1~3の記載から予測できない効果が奏せられたものである。

したがって、請求の範囲1-16, 18の発明には、新規性、進歩性がある。

特許協力条約に基づく国際出願願書

JA904421

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月21日 (21.08.2000) 月曜日 10時08分21秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.10.1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	JA904421
I	発明の名称	肝炎ウイルスの増殖方法及び装置
II	出願人	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
II-1	この欄に記載した者は	すべての指定国 (all designated States)
II-2	右の指定国についての出願人である。	
II-4ja	氏名(姓名)	永森 静志
II-4en	Name (LAST, First)	NAGAMORI, Seishi
II-5ja	あて名:	105-0003 日本国 東京都 港区 西新橋三丁目25番8号 東京慈恵会医科大学内
II-5en	Address:	c/o Jikei University School of Medicine 3-25-8, Nishi-shinbashi Minato-ku, Tokyo 105-0003 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP

特許協力条約に基づく国際出願願書

JA904421

原本 (出願用) - 印刷日時 2000年08月21日 (21.08.2000) 月曜日 10時08分21秒

III-1 III-1-1 III-1-2 III-1-4ja III-1-4en III-1-5ja	<p>その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は 右の指定国についての出願人である。</p> <p>氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:</p>	<p>出願人である (applicant only) 米国を除くすべての指定国 (all designated States except US) 宮村 達男 MIYAMURA, Tatsuo 162-8640 日本国 東京都 新宿区 戸山一丁目23番1号 国立感染症研究所内 c/o Department of Virology II, National Institute of Infectious Diseases 1-23-1, Toyama Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640 Japan 日本国 JP 日本国 JP</p>
III-1-5en	Address:	
III-1-6 III-1-7	<p>国籍 (国名) 住所 (国名)</p>	<p>日本国 JP 日本国 JP</p>
IV-1 IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	<p>代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。</p> <p>氏名 (姓名) Name (LAST, First) あて名:</p>	<p>代理人 (agent) 佐伯 憲生 SAEKI, Norio 103-0027 日本国 東京都 中央区 日本橋三丁目15番2号 高愛ビル 9階 9th floor, Taka-ai Building 15-2, Nihonbashi 3-chome Chuo-ku, Tokyo 103-0027 Japan 03-5205-2521 03-5205-2522</p>
IV-1-2en	Address:	
IV-1-3 IV-1-4	<p>電話番号 ファクシミリ番号</p>	<p>03-5205-2521 03-5205-2522</p>
V V-1	<p>国の指定 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)</p>	<p>EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国</p>
V-2	<p>国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)</p>	<p>JP KR US</p>
V-5	<p>指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。</p>	

特許協力条約に基づく国際出願願書

JA904421

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月21日（21.08.2000）月曜日 10時08分21秒

V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	先の出願日	1999年08月20日 (20.08.1999)	
VI-1-2	先の出願番号	平成11年特許願第233647号	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VI-2	優先権 証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
VIII-1	願書	4	-
VIII-2	明細書（配列表を除く）	24	-
VIII-3	請求の範囲	2	-
VIII-4	要約	1	ja90442c.txt
VIII-5	図面	8	-
VIII-6	明細書の配列表	3	-
VIII-7	合計	42	
VIII-8	添付書類	添付	添付された電子データ
VIII-8	手数料計算用紙	✓	-
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓	-
VIII-15	計算機読取可能な媒体によるマルチメディア及び/又はアミノ酸配列リスト		別個のフレキシブルディスク
VIII-16	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	-
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面	-
VIII-17	その他	陳述書	-
VIII-17	その他	フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記録した書面	-
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号	1	
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)	
IX-1	提出者の記名押印		
IX-1-1	氏名(姓名)	佐伯 憲生	

受理官庁記入欄

T0-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
T0-2	図面:	
T0-2-1	受理された	
T0-2-2	不足図面がある	



特許協力条約に基づく国際出願願書

JA904421

原本（出願用） - 印刷日時 2000年08月21日（21.08.2000）月曜日 10時08分21秒

10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--